

WIRKUNGSVERGLEICH
VON
SOLANUM MALACOXYLON,
TRisetum FLAVESCENS,
1,25-DIHYDROXYCHOLECALCIFEROL,
1,25-DIHYDROXYERGOCALCIFEROL
UND
24,25-DIHYDROXYCHOLECALCIFEROL
AM RACHITISCHEN HÜHNERKÜKEN

Curt Tröger

*hss
inchen
St*

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

**WIRKUNGSVERGLEICH VON SOLANUM MALACOXYLON, TRISETUM
FLAVESCENS, 1,25-DIHYDROXYCHOLECALCIFEROL,
1,25-DIHYDROXYERGOCALCIFEROL UND
24,25-DIHYDROXYCHOLECALCIFEROL
AM RACHITISCHEN HÜHNERKÜKEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Curt Tröger

aus

Laichingen

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. H. Zucker

Korreferent: Prof. Dr. Dr.h.c. G. Dirksen

Tag der Promotion: 27. Juli 1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Vorbemerkungen	3
----------------------------------	---

2. Literaturverzeichnis	5
-------------------------	---

3. Versuchsaufbau	7
-------------------	---

3.1 Versuch 1, Versuch 2, Versuch 3, Versuch 4	7
--	---

3.2 Versuch 5, Versuch 6, Versuch 7, Versuch 8	7
--	---

3.3 Versuch 9, Versuch 10, Versuch 11, Versuch 12	7
---	---

3.4 Versuch 13, Versuch 14, Versuch 15, Versuch 16	7
--	---

3.5 Versuch 17, Versuch 18, Versuch 19, Versuch 20	7
--	---

3.6 Versuch 21, Versuch 22, Versuch 23, Versuch 24	7
--	---

3.7 Versuch 25, Versuch 26, Versuch 27, Versuch 28	7
--	---

3.8 Versuch 29, Versuch 30, Versuch 31, Versuch 32	7
--	---

3.9 Versuch 33, Versuch 34, Versuch 35, Versuch 36	7
--	---

4. Ergebnisse und Diskussion	11
------------------------------	----

4.1 Versuch 1, Versuch 2, Versuch 3, Versuch 4	11
--	----

4.2 Versuch 5, Versuch 6, Versuch 7, Versuch 8	11
--	----

4.3 Versuch 9, Versuch 10, Versuch 11, Versuch 12	11
---	----

4.4 Versuch 13, Versuch 14, Versuch 15, Versuch 16	11
--	----

4.5 Versuch 17, Versuch 18, Versuch 19, Versuch 20	11
--	----

4.6 Versuch 21, Versuch 22, Versuch 23, Versuch 24	11
--	----

4.7 Versuch 25, Versuch 26, Versuch 27, Versuch 28	11
--	----

4.8 Versuch 29, Versuch 30, Versuch 31, Versuch 32	11
--	----

4.9 Versuch 33, Versuch 34, Versuch 35, Versuch 36	11
--	----

4.10 Versuch 37, Versuch 38, Versuch 39, Versuch 40	11
---	----

4.11 Versuch 41, Versuch 42, Versuch 43, Versuch 44	11
---	----

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsübersicht

Seite

1.	Einleitung und Problemstellung	3
2.	Literaturübersicht	6
2.1	VITAMIN D_3 -STOFFWECHSEL	6
2.1.1	Vitamin D_3 , $25(OH)D_3$ und $1,25(OH)_2D_3$	6
2.1.2	Wirkungen von $1,25(OH)_2D_3$ auf die Darmmukosazelle	8
2.1.3	Das Modell der strontiuminduzierten Rachitis	9
2.1.4	$24,25(OH)_2D_3$, ein weiterer Metabolit des Vitamin D_3 -Stoffwechsels	10
2.2	VITAMIN D_2 - METABOLISMUS UND WIRKSAMKEIT IM VERGLEICH ZU VITAMIN D_3	13
2.3	CALCINOGENE PFLANZEN	18
2.3.1	Übersicht	18
2.3.2	Das Wirkprinzip von <i>Solanum malacoxylon</i>	20
2.3.3	Vitamin D-artige Aktivität in <i>Trisetum</i> <i>flavescens</i>	22
3.	Eigene Untersuchungen	25
3.1	VERSUCHSTIERE	25
3.2	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	26
3.3	FUTTER	28
3.4	VITAMIN D-WIRKSAME DIÄTZUSÄTZE	34
3.5	PROBENNAHME UND BESTIMMUNGSMETHODEN	36

4.	Versuchsbeschreibung und Ergebnisse	41
4.1	VERSUCH I	41
4.2	VERSUCH II	46
4.3	VERSUCH III a	50
4.4	VERSUCH III b	55
4.5	VERSUCH IV	59
4.6	VERSUCH V	64
5.	Diskussion	70
5.1	1,25(OH) ₂ D ₃ -ARTIGE AKTIVITÄT VON SOLANUM MALACOXYLON UND TRISETUM FLAVESCENS	70
5.2	DIE ANTIRACHITISCHE AKTIVITÄT VON 1,25-DIHYDROXYERGOCALCIFEROL (1,25(OH) ₂ D ₂) .	74
5.3	STIMULIERENDER EFFEKT VON 24,25(OH) ₂ D ₃ auf DIE WIRKUNG VON 1,25(OH) ₂ D ₃	77
6.	Zusammenfassung	80
	Summary	82
7.	Literaturverzeichnis	84

1. Einleitung und Problemstellung

Die Entdeckung des antirachitisch wirksamen Vitamin D erbrachte einen großen Fortschritt in der Behandlung von Rachitis. Heute ist Rachitis durch prophylaktische Verabreichung von Vitamin D bei Mensch und Tier sehr selten geworden.

In den letzten zwei Jahrzehnten konnten die Kenntnisse über die Funktion und die Metabolisierung von Vitamin D durch intensive Forschung vielseitig erweitert werden. Dabei wurde auch erkannt, daß verschiedene Störungen nur durch Metaboliten von Vitamin D behandelt werden können, während der Einsatz von Vitamin D selbst nur einen geringen oder gar keinen therapeutischen Nutzen erbringt. Für den Einsatz von Vitamin D-Metaboliten ergaben sich daraus in der Tier- und Humanmedizin ganz neue Indikationsgebiete.

So kann z. B. die hypocalcämische Gebärfähigkeit, eine bei Milchkühen häufig auftretende Störung des Mineralstoffwechsels, durch zum richtigen Zeitpunkt verabreichtes $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oder $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ fast vollständig verhütet werden. Auch durch den Einsatz der calcinogenen Pflanze *Solanum malacoxylon* konnten bezüglich der Milchfieberprophylaxe positive Ergebnisse erzielt werden. Desweiteren wird heute versucht, *S. malacoxylon* und Vitamin D-Metaboliten bei Hühnern zur Verbesserung der Eischalenqualität einzusetzen.

Auch in der Humanmedizin wird das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Praxis eingesetzt. Ein wichtiges Anwendungsgebiet sind dabei eine Reihe von Krankheiten, die unter dem Begriff der renalen Osteodystrophie zusammengefaßt werden können. Diesen Krankheiten ist die Beeinträchtigung der renalen Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gemeinsam. Die daraus resultierende Störung des Mineralstoffwechsels kann folglich nur mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -artig wirksamen Substanzen behandelt werden. Durch den Ein-

satz von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kann die Calciumresorption aus dem Darm gesteigert und damit die Wiederherstellung der Calciumhomöostase positiv beeinflusst werden. Eine Reihe von Nebenwirkungen wie gesteigerte Calciumresorption aus dem Knochen und die geringe therapeutische Breite von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ machen allerdings auch deutlich, daß die Therapie mit dieser Substanz noch nicht befriedigen kann. Daher wird in den letzten Jahren die Suche nach einem ähnlich wirksamen, aber weniger gefährlichen Metaboliten intensiv vorangetrieben. Unter anderem gilt das Interesse dabei auch den metabolitartig wirksamen Inhaltsstoffen von *Trisetum flavescens* (Goldhafer) und *S. malacoxylon*.

In den eigenen Untersuchungen sollte daher die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -artige Aktivität von verschiedenen Goldhaferchargen und von *S. malacoxylon* bestimmt werden. Gleichzeitig wurde der weiterführenden Frage nachgegangen, in welchem Lösungsmittel sich die metabolitartig wirksame Komponente des Goldhafers anreichert.

Solange noch nicht geklärt ist, ob die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -artige Aktivität des Goldhafers tatsächlich auf die Vitamin D_3 -Reihe zurückzuführen ist, besteht auch noch die Möglichkeit, daß ein Vitamin D_2 -Metabolit für die metabolitartige Aktivität des Goldhafers verantwortlich ist. Das erstmals chemisch synthetisierte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ sollte daher mit dem aktiven Prinzip von Goldhafer verglichen werden.

Seit langem ist bekannt, daß beim Vogel Vitamin D_2 eine sehr viel geringere Wirksamkeit besitzt als Vitamin D_3 . Eine unterschiedliche Resorptionsrate beider D-Vitamine, eine unzureichende Metabolisierung oder eine schnellere Ausscheidung von Vitamin D_2 könnten dafür verantwortlich sein. Mit dem synthetischen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ sollte die Frage nach der Art der Diskriminierung gegen Vitamin D_2 untersucht und der Punkt, an dem die Diskriminierung erfolgt, näher bestimmt

werden.

Im Goldhafer, in dem Vitamin D_3 und eine Vitamin D-metabolit-artig wirksame Komponente nachgewiesen werden konnte, liegt möglicherweise ein ganzes Spektrum von Vitamin D-Verbindungen vor. Auch $24,25(OH)_2D_3$, das ja neben $1,25(OH)_2D_3$ im Organismus aus Vitamin D_3 synthetisiert wird, könnte eine dieser Verbindungen sein. In dieser Arbeit sollte deshalb $24,25(OH)_2D_3$, allein und in Verbindung mit $1,25(OH)_2D_3$, im Vergleich zu Goldhafer untersucht werden.

2. Literaturübersicht

2.1 VITAMIN D_3 -STOFFWECHSEL

2.1.1 Vitamin D_3 , $25(OH)D_3$ und $1,25(OH)_2D_3$

Der Bedarf an Vitamin D kann entweder durch die Aufnahme des fettlöslichen Vitamins über die Nahrung oder durch die Eigenbildung von Vitamin D_3 im Organismus gedeckt werden. Die Vorstufe von Vitamin D_3 , das 7-Dehydrocholesterol, wird dabei auf enzymatischem Wege in der Haut synthetisiert. Durch Einwirkung von UV-Strahlung und anschließender thermischer Isomerisierung entsteht Vitamin D_3 . Die hydrophobe Natur dieses fettlöslichen Vitamins limitiert die Konzentration an freien Molekülen im Blut. Daher wird das Vitamin im Blut, gebunden an ein spezifisches, Vitamin D-bindendes Protein (DBP), transportiert. Das DBP ist aus dem Plasma einer Vielzahl von Wirbeltierarten isoliert worden (EDELSTEIN et al., 1973; HAY and WATSON, 1976a, 1976b).

Die Leber ist der Hauptort der Hydroxylierung des Vitamins am C-25-Atom (HORSTING and DELUCA, 1969; OLSEN et al., 1976). Das dazu notwendige Enzym Vitamin D_3 -25-Hydroxylase benötigt Magnesium, Sauerstoff und NADPH zu dieser Reaktion, die sowohl im endoplasmatischen Retikulum (BHATTACHARYYA and DELUCA, 1974) als auch gebunden an die Mitochondrien der Leberzellen stattfindet (BJÖRKHEM and HOLMBERG, 1978). Der entstehende Metabolit $25(OH)D_3$ wird über die Blutbahn zur Niere transportiert, die mitochondrial das Enzym $25(OH)D_3$ - 1α -Hydroxylase enthält (GRAY et al., 1972; HENRY and NORMAN, 1976). Unter Mitwirkung der Kofaktoren Cytochrom P-450 (GHAZARIAN et al., 1974), einer Ferredoxinreduktase und einem Ferredoxin (PEDERSEN et al., 1976) wird der Metabolit $1,25(OH)_2D_3$ synthetisiert, der die stoffwechselaktive Form des Vitamin D_3 in Bezug auf den intestinalen Calciumtrans-

port (BOYLE et al., 1972), Calciummobilisation aus dem Knochen (HOLICK et al., 1972a) und intestinalen Phosphattransport (CHEN et al., 1974) darstellt. Dieser physiologisch wichtigste Metabolit wird auf Grund der körpereigenen Bildung und seiner Wirkungsweise im Organismus entsprechend der eines klassischen Steroidhormons heute allgemein als Hormon angesehen.

Die Regulation der Produktion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ unterliegt einer exakten Bedarfssteuerung, wobei die $25(\text{OH})\text{D}_3$ - 1α -Hydroxylase als Schlüsselenzym fungiert (ROSS and HENRY, 1980). Während das Parathormon (HENRY, 1982), niedriger Serumcalcium- und niedriger Serumphosphatspiegel (HUGHES et al., 1975; FRIEDLANDER et al., 1977) die 1α -Hydroxylase aktivieren, wirkt $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ selbst über Produkthemmung auf das Enzym. Auch andere Hormone wie Calcitonin, Insulin, Sexualhormone, Prolaktin und das Wachstumshormon haben auf diesen Regelkreis Einfluß (NORMAN et al., 1982).

Der Transport von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu den Erfolgsorganen erfolgt gebunden an das spezifische, Vitamin D-bindende Transportprotein (DBP) (BOUILLON and VAN BAELEN, 1980). Spezielle Rezeptoren für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in den Zielorganen wie Knochengewebe (MANOLAGAS et al., 1979), Darm (WECKSLER et al., 1979), Parathyreoidea (BRUMBAUGH et al., 1975) und Niere (CHRISTAKOS and NORMAN, 1979) sind heute nachgewiesen. Auch andere Organe wie Hypophyse, Pankreas, Mamma und Haut besitzen solche Rezeptoren, was darauf hindeutet, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auch dort eine Funktion besitzt (SCHAEFER und VON HERRATH, 1981).

2.1.2 Wirkungen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf die Darmmukosazelle

WASSERMAN und TAYLOR (1966) berichteten das erste Mal von einem Vitamin D-abhängigen calciumbindenden Protein (CaBP) in der Darmmukosa. In der Zwischenzeit wurden calciumbindende Proteine aus einer Vielzahl von Geweben verschiedener Tierarten isoliert (NORMAN et al., 1982). Die Untersuchung von WASSERMAN und CORRADINO (1973) ergab einen direkten Zusammenhang zwischen CaBP-Konzentration, Calciumabsorption und Vitamin D in einem großen Bereich physiologischer Verhältnisse. Bezüglich der Induktion der CaBP-Synthese in der Darmmukosazelle ist dabei $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ der wirksamste von allen Vitamin D-Metaboliten (FRANCESCHI and DELUCA, 1981). Nach Eindringen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in die Darmzelle und Bindung desselben an den cytosolischen Rezeptor (WECKSLER et al., 1979) induziert der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Rezeptorkomplex im Kern der Zelle die Proteinbiosynthese von CaBP (CHARLES et al., 1981) und von anderen Proteinen (WASSERMAN and FULLMER, 1983). Die größte CaBP-Konzentration befindet sich nach Bildung dieses Proteins im cytosolischen Kompartiment der Darmmukosazelle (TAYLOR, 1981).

Bis heute weiß man noch nicht, welche Aufgabe genau das CaBP bei der Calciumabsorption einnimmt, allerdings nimmt man an, daß es in der Zelle eine Schutzfunktion gegenüber zu hohen Calciumkonzentrationen besitzt (DELUCA and SCHNOES, 1983). In der intestinalen Mukosazelle von Vitamin D-mangelernährten Tieren befindet sich praktisch kein CaBP, erst nach einer Latenzzeit von 2 - 3 Stunden nach Injektion von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist es dort nachweisbar (WASSERMAN et al., 1977; TAYLOR, 1982).

Man weiß aber auch, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ am Darm rachitischer Tiere eine Wirkung besitzt, die vor dem Vorhandensein von CaBP einsetzt und die sich in einer gesteigerten Calciumauf-

nahme in die Zelle äußert, begleitet von einer Akkumulation des Calciums in den Mitochondrien (BIKLE et al., 1979) und im Golgiapparat (MAC LAUGHLIN et al., 1980).

Eine Erklärung hierfür lieferten RASMUSSEN et al. (1982), die am Darm von rachitischen Hühnern feststellten, daß sich unter $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Wirkung die Phospholipidzusammensetzung der Bürstensaummembran verändert, wodurch die Fluidität und die Transporteigenschaften dieser Membran beeinflußt werden sollen. Zu den gleichen Ergebnissen kamen ELGAVISH et al. (1983) bei der Untersuchung isolierter Bürstensaummembranen von Kaninchennierentubuli.

Nach der Bildung von CaBP verringert sich die Calciumkonzentration in den Mitochondrien, was andeutet, daß die Freisetzung von Calcium und der Transport durch die basallaterale Membran durch die Anwesenheit von CaBP gesteigert wird (WASSERMAN and FULLMER, 1983).

Bezüglich des Transportes von Calcium durch die basallaterale Membran konnte außerdem festgestellt werden, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aktivierend auf eine in dieser Membran vorkommende Ca^{2+} -abhängige ATPase wirkt, die dort als Ca^{2+} -Pumpe fungieren soll (GHISJEN et al., 1982).

Demnach muß man heute annehmen, daß Vitamin D nicht nur eine Primärwirkung in der Darmmukosazelle besitzt, sondern alle drei Phasen der Calciumabsorption, die Aufnahme in, die Durchschleusung durch und die Ausschleusung von Calcium aus der Zelle über spezifische Wirkungen beeinflußt.

2.1.3 Das Modell der strontiuminduzierten Rachitis

Die Resorption von Strontium, das ein dem Calcium chemisch sehr ähnliches Element ist, wird erwiesenermaßen ebenfalls durch die Wirkung von Vitamin D gesteigert.

Durch Verabreichung von Strontium konnten OMDAHL und DELUCA (1972) eine Rachitis erzeugen, die auf unphysiologischer Blockierung der 1α -Hydroxylase in der Niere beruht. Der Wirkungsmechanismus von Strontium ist dabei noch nicht geklärt. Die Hemmung der 1α -Hydroxylase hat zur Folge, daß selbst bei Verabreichung einer hohen Vitamin D-Dosis kein $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gebildet werden kann. Das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist aber der wirksamste Vitamin D-Metabolit bezüglich der Induktion der CaBP-Synthese und der anderen, oben beschriebenen Wirkungen auf den Darm. Das wiederum bedeutet, daß bei der strontiuminduzierten Rachitis die Calciumabsorption durch Vitamin D_3 nicht beeinflußt werden kann, während die bereits am C-1-Atom hydroxylierten Metaboliten von Vitamin D_3 , $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und 1α -Analoge, weiterhin ihre volle Wirkung auf die Darmzelle besitzen. Damit hat man ein Modell zur Verfügung, um zwischen einer Vitamin D_3 -artigen und einer $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -ähnlichen Wirkung zu unterscheiden, was die Möglichkeit eröffnet, unbekannte Vitamin D-wirksame Substanzen speziell auf ihre $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -artige Wirkung zu untersuchen.

2.1.4 $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ein weiterer Metabolit des Vitamin D_3 -Stoffwechsels

Heute sind ungefähr 20 Metaboliten von Vitamin D_3 bekannt und chemisch charakterisiert. Ein Weg der Metabolisierung von $25(\text{OH})\text{D}_3$ ist die Hydroxylierung zu $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (HOLICK et al., 1972b), ein in Bezug auf seine biologische Wirksamkeit heute sehr umstrittener Metabolit.

Das Enzym zur Bildung dieses Metaboliten, die $25(\text{OH})\text{D}_3$ -24-Hydroxylase, konnte aus der Mitochondrienfraktion der Nierenzellen isoliert werden (KNUTSON et al., 1974), der Struktur, an die auch die $25(\text{OH})\text{D}_3$ - 1α -Hydroxylase gebunden ist. Neben der Niere konnte dieses Enzym aber auch im Gegensatz

zu der 1α -Hydroxylase im Knorpelgewebe von Huhn und Kaninchen (GARABEDIAN et al., 1978) und im Dünndarm der Ratte (KUMAR et al., 1978) nachgewiesen werden. Die veränderliche Aktivität der 24-Hydroxylase wurde erstmals von BOYLE et al. (1971) beschrieben. Bei der Regulation dieses Enzyms sollen dabei verschiedene Faktoren Einfluß haben.

Parathormon steigert die Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und hemmt die von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, wobei der Mechanismus, über den das Parathormon den $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Metabolismus beeinflusst, unklar ist (HENRY, 1982). Demgegenüber stimulieren $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und ein hoher extrazellulärer Calciumspiegel die Bildung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (HENRY, 1979; JUAN and DELUCA, 1977).

Dies bedeutet aber, daß über diesen Regulationsmechanismus bei einer Aktivierung der 1α -Hydroxylase durch die oben erwähnten Faktoren gleichzeitig die 24-Hydroxylase gehemmt, bei einer Hemmung der 1α -Hydroxylase die 24-Hydroxylase aktiviert wird. Die Regulation der Bildung beider Metaboliten verläuft folglich invers, gleichzeitig sind aber auch beide Metaboliten physiologischerweise im Körper vorhanden. Die biologische Bedeutung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wird heute unterschiedlich beurteilt. Dabei werden folgende drei Ansichten vertreten (NORMAN et al., 1982):

- 1.) $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ besitzt eine eigenständige Wirkung
- 2.) $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist nur zusammen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wirksam
- 3.) $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ist als unwirksames Zwischenprodukt des Vitamin D_3 -Stoffwechsels aufzufassen.

Bei Säugern und Vögeln soll $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ für die normale Skelettentwicklung notwendig sein durch Steigerung der Knochenmineralisation und Hemmung der Parathormonsekretion (MALLUCHE et al., 1980; CANTERBURY et al., 1978). Auch RASMUSSEN und BORDIER (1980) und KANIS et al. (1978) kamen durch ihre Untersuchungen zu der Überzeugung, daß $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ am Knochen eine von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verschiedene, ja sogar gegen-

teilige Wirkung entfaltet. Die Biosynthese wie auch die Sekretion von Proteoglykanen in isolierten Rattenchondrozyten wird durch $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ selbst bei physiologisch niedrigen Konzentrationen stimuliert, genauso wie die Polymeraseaktivität (CORVOL et al., 1978; 1979). Diese Untersuchungen sprechen für eine eigenständige Wirkung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an Knorpel und Knochen.

Demgegenüber konnten TANAKA et al., (1979) und HALLORAN et al. (1981) durch Blockieren der Hydroxylierung am C-24-Atom mittels Fluoratomen nachweisen, daß bei Einsatz des $24,24\text{-F}_2\text{-}25(\text{OH})\text{D}_3$ bei rachitischen Ratten Knochenwachstum und Knochenmineralisation keine Besonderheiten aufwiesen. Zu den gleichen Ergebnissen, nämlich daß sich das Skelett trotz Verhinderung der Bildung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mittels $24,24\text{-F}_2\text{-}25(\text{OH})\text{D}_3$ normal entwickelt, kamen auch BROMMAGE et al. (1983) und DELUCA (1983).

Eine Untersuchung von WENDELAAR BONGA et al. (1983) an Fischen kommt zu dem Ergebnis, daß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ganz bestimmte, aber unterschiedliche physiologische Funktionen am Knochen dieser Fische erfüllen, eine Überlegung, die eventuell auch für Säugetiere zutreffen könnte. Der $24,25$ -Metabolit induzierte dabei appositionelles Knochenwachstum, während der $1,25$ -Metabolit die Osteoblastenaktivität hemmte und zur Demineralisation des Knochens führte. WIENTROUB und REDDI (1982) untersuchten die Wirkung dieser beiden Metaboliten auf die Knochenentwicklung bei der Ratte und kamen dabei zu ähnlichen Ergebnissen.

In einem Versuch an Hühnern konnte nachgewiesen werden, daß Hühner, die nur $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zur Verfügung hatten, zwar normal Eier legten, die Schlupfrate aber gleich Null war. Demgegenüber konnte durch gleichzeitige Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine normale Schlupfrate erzielt werden (HENRY and NORMAN, 1978).

BARBARYKIN et al. (1982) stellten fest, daß $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -ähnliche, aber quantitativ geringere Wirkung als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bezüglich verschiedener Vitamin D-abhängiger Parameter besitzt. Bei kombinierter Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zeigte sich eine Potenzierung der Einzelwirkungen beider Metaboliten.

Die hier angeführten Beispiele lassen alle Deutungsmöglichkeiten offen. Erst weitere Untersuchungen werden Aufschluß über die genaue Funktion von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Vitamin D_3 -Stoffwechsel geben.

2.2 VITAMIN D_2 - METABOLISMUS UND WIRKSAMKEIT IM VERGLEICH ZU VITAMIN D_3

Vitamin D_2 bzw. Ergocalciferol unterscheidet sich von Vitamin D_3 bzw. Cholecalciferol durch eine Methylgruppe, gebunden an das C-24-Atom der Seitenkette und eine Doppelbindung zwischen C-22 und C-23. Es entsteht aus Ergosterol durch UV-Bestrahlung, z. B. im Heu bei Sontentrocknung.

Der prinzipielle Unterschied zwischen diesen beiden D-Vitaminen besteht darin, daß Vitamin D_3 vom Tier synthetisiert werden kann, das Vitamin D_2 dagegen nicht. Daher galt Vitamin D_2 lange Zeit als das pflanzliche, Vitamin D_3 als das tierische Vitamin D, bis auch das Vitamin D_3 aus einer Pflanze, dem Goldhafer, isoliert werden konnte (RAMBECK et al., 1979). Die Bedeutung des Vitamin D_2 liegt darin, daß dieses Vitamin in früheren Jahrzehnten die Hauptmenge des in synthetischer Form eingesetzten Vitamin D darstellte. Vor allem aus mit ultraviolettem Licht bestrahlten Hefen kann es in beträchtlichen Mengen bis zu 100.000 IE/g gewonnen werden (AMMON und DIRSCHERL, 1974).

Frühere Studien weisen darauf hin, daß die beiden Prohormone Vitamin D_3 und D_2 bei Säugetieren gleiche Wirksamkeit zeigen (NORMAN, 1979). Auf der anderen Seite ist schon lange bekannt, daß bei Vögeln Vitamin D_2 nur ca. 1/100 (STEENBOCK et al., 1932) bis 1/10 (CHEN and BOSMANN, 1964) der antirachitischen Wirksamkeit von Vitamin D_3 besitzt.

HUNT et al. (1967) demonstrierten in einer Untersuchung, daß die biologische Aktivität von Vitamin D_2 bei einigen Neuweltaffenarten ebenfalls geringer ist als die von Vitamin D_3 .

Bei der Ratte scheinen Vitamin D_2 und D_3 bei niedriger Dosierung gleich aktiv zu sein in Bezug auf Stimulierung des intestinalen Calciumtransportes, der Calciummobilisation aus dem Knochen und der Calcifikation rachitischen Knorpels (NAPOLI et al., 1979).

Eine geringere biologische Wirksamkeit von Vitamin D_2 bei der Regenbogenforelle zeigt eine Diskriminierung gegenüber dem D_2 -Vitamin bei Fischen auf, wobei Vitamin D bei dieser Fischart für die normale Funktion der weißen Muskulatur benötigt zu werden scheint, ohne den Plasmacalciumspiegel zu beeinflussen (BARNETT et al., 1982).

In einer neueren Untersuchung von HORST et al. (1982) konnte durch Messung der Plasmakonzentrationen von Vitamin D und dessen 25-Hydroxymetaboliten nachgewiesen werden, daß bei oraler Verabreichung gleicher Mengen Vitamin D_2 und D_3 die Vitamin D_3 -Konzentration im Plasma von Schwein und Ratte zwar höher lag als die Vitamin D_2 -Konzentration, auf der anderen Seite wurde aber bei der Ratte eine 2,5-fache höhere Konzentration an $25(OH)D_2$ gegenüber $25(OH)D_3$ gemessen, was den ersten Nachweis einer Bevorzugung von Vitamin D_2 beim Säugetier darstellen würde. Beim Hühnerküken dagegen lagen, wie erwartet, alle gemessenen Vitamin D_3 - und Vitamin D_3 -Metabolitkonzentrationen deutlich über den entsprechenden

Vitamin D_2 -Werten. Da das Verhältnis der Plasmakonzentrationen von Vitamin D_3 zu Vitamin D_2 und $25(OH)D_3$ zu $25(OH)D_2$ sich beim Huhn vergleichsweise nur wenig änderte, folgerten HORST et al. (1982), daß die Hauptdiskriminierung gegenüber Vitamin D_2 vor der Hydroxylierung zum 25-Hydroxymetaboliten stattfindet und eventuell mit einer schlechteren Resorption oder einer schnelleren Ausscheidung von Vitamin D_2 aus dem Blut zusammenhängen könnte.

Den Metabolismus von Vitamin D_2 betreffend konnten DRESCHER et al. (1969) aufzeigen, daß das Huhn Vitamin D_2 entsprechend Vitamin D_3 in ungefähr gleicher Rate zu einem biologisch aktiveren, polaren Metaboliten umbildet. Im gleichen Jahr gelang die Isolierung dieses Metaboliten, der als $25(OH)D_2$ identifiziert werden konnte (SUDA et al., 1969). Es konnte gezeigt werden, daß $25(OH)D_2$ bezüglich der Heilung von Rachitis bei Ratten 1,5-fache Aktivität von Vitamin D_2 und Vitamin D_3 entfaltet und damit gleich effektiv ist wie $25(OH)D_3$. Auch die schnellere Wirkung dieses Metaboliten gegenüber Vitamin D_2 bezüglich der Induktion des intestinalen Calciumtransportes und der Mobilisation von Calcium aus dem Knochen wurde in dieser Untersuchung nachgewiesen (SUDA et al., 1970).

JONES et. al. (1975) gelang es, den 1,25-Dihydroxymetaboliten von Vitamin D_2 in einem in vitro Versuch aus HühnERNIERENMITOCHONDRIEN zu isolieren und mittels Massenspektrometrie und ultravioletter Absorptionsspektrophotometrie zu identifizieren. Die Biosynthese mittels Nierenhomogenaten lieferte ungefähr 4 μg relativ reines $1,25(OH)_2D_2$. In dieser Untersuchung wurde ebenfalls festgestellt, daß bei der Ratte $1,25(OH)_2D_2$ eine ungefähr gleich große antirachitische Aktivität besitzt wie der entsprechende Vitamin D_3 -Metabolit. Demgegenüber gelang JONES et al. (1976a) bei Hühnern der Nachweis, daß bei intravenöser Verabreichung von aus Nieren-

mitochondrien gewonnenem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ dieser Metabolit nur 1/5 bis 1/10 der Aktivität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ entfaltet. Der gleichen Gruppe gelang auch die Isolierung und Identifizierung von $24,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ aus einem Perfusionsmodell an Ratten nieren nach Inkubation mit synthetischem $25(\text{OH})\text{D}_2$. Mittels radioaktiv markiertem Vitamin D_2 konnten sie diesen Metaboliten auch aus dem Plasma von Ratten isolieren (JONES et al., 1979) sowie einen anderen neuen Metaboliten, das $24(\text{OH})\text{D}_2$ (JONES et al., 1980).

JONES et al. (1976b) stellten in einer in vitro Studie fest, daß das Huhn in der Leber das Enzym zur Bildung von $25(\text{OH})\text{D}_2$, in der Niere die Enzyme zur Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ besitzt. Die Syntheserate von $25(\text{OH})\text{D}_2$ und $25(\text{OH})\text{D}_3$ in der Leber unterschied sich dabei bei keiner der eingesetzten Substratkonzentrationen; die K_m und V_{max} der 1α -Hydroxylase in der Niere waren bei Einsatz der Substrate $25(\text{OH})\text{D}_2$ und $25(\text{OH})\text{D}_3$ ebenfalls identisch, so daß sie auf Grund der Ähnlichkeit der Enzymkinetik zu dem Schluß kamen, daß Vitamin D_2 und Vitamin D_3 durch das gleiche Enzymsystem metabolisiert werden.

Eine zweite mögliche Ursache für die geringere Wirksamkeit von Vitamin D_2 beim Huhn betrifft das spezifische, Vitamin D-bindende Transportprotein (DBP). Dieses Protein bindet $25(\text{OH})\text{D}_2$ und $25(\text{OH})\text{D}_3$ gleich stark bei der Ratte. Beim Huhn dagegen war die 15-fache Menge $25(\text{OH})\text{D}_2$ nötig, um 50 % radioaktiv markiertes $25(\text{OH})\text{D}_3$ aus der Bindung zu verdrängen (BELSEY et al., 1974).

Die Rezeptorbindung am isolierten Darm zeigte für die $1,25$ -Dihydroxymetaboliten von Vitamin D_2 und D_3 dagegen in einem in vitro Versuch am Huhn gleiche Bindungsstärke (KREAM et al., 1977).

Weitere Untersuchungen beziehen sich auf die Ausscheidung von Vitamin D_2 -Metaboliten. Dabei soll der Metabolismus von Vitamin D_3 und Vitamin D_2 über die gleichen Zwischenprodukte

laufen mit der möglichen Ausnahme, daß das 25(OH)D-23,26-lakton nur von Vitamin D₃ gebildet wird (HORST et al., 1981). Es ist bekannt, daß polare Metaboliten von Vitamin D₃ und D₂-Analoge beim Menschen, beim Huhn und bei der Ratte über die Galle ausgeschieden werden, wobei die Metaboliten, zumindest zum Teil, Konjugate der intakten Sterole darstellen (KUMAR et al., 1981; WIESNER et al., 1980; WIESNER et al., 1981; LE VAN et al., 1981).

IMRIE et al., (1967) stellten mittels radioaktiv markiertem Vitamin D₂ und D₃ fest, daß das Vitamin D₂ oder ein daraus gebildeter Metabolit gegenüber Vitamin D₃ beim Vogel wesentlich schneller über die Galle ausgeschieden wird. Während die Radioaktivität von Vitamin D₃ über 24 Stunden im Blut, im Knochen und in der Muskulatur in ungefähr gleicher Konzentration vorhanden blieb, verschwand die Radioaktivität von Vitamin D₂ sehr schnell aus dem Blut, weniger schnell aus Muskulatur und Knochen. Die ursprüngliche Aufnahme beider D-Vitamine war bei allen untersuchten Geweben gleich gut.

Bei Vögeln konnte ein solcher bilärer Metabolit isoliert werden, nämlich das 25(OH)D₂-25-Glucuronid, das bei diesen einen wichtigen Metaboliten des 25(OH)D₂ verkörpern soll (LE VAN et al., 1981).

Ein anderer Metabolit von Vitamin D₂, das Vitamin D₂-Sulfat, wurde in Kaninchenurin gefunden und gleichzeitig wurde nachgewiesen, daß auch Rattenleberhomogenate in der Lage sind, diesen Metaboliten zu synthetisieren (HIGAKI et al., 1965). KUMAR et al. (1982) synthetisierten Vitamin D₂-3 β -Glucosiduronat und Vitamin D₂-3 β -Sulfat und untersuchten die biologische Wirksamkeit dieser Metaboliten an Ratten. Bei intravenöser Verabreichung zeigte das Glucosiduronat Aktivität bezüglich Calciummobilisation aus dem Knochen und Steigerung des intestinalen Calciumtransportes, allerdings erreichte die biologische Wirksamkeit nur ca. 10 % der Aktivität des freien Vitamin D₂. Das Vitamin D₂-3 β -Sulfat dagegen war inaktiv. Die entsprechenden Vitamin D₃-Analoge verhielten

sich beim gleichen Versuchstier in ähnlicher Weise (NAGABUNDI et al., 1980; NAGABUNDI et al., 1981).

Ein anderer Metabolit, das $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ wurde von LAM et al. (1977) synthetisiert. Durch neue Fortschritte in der Synthese dieses Metaboliten (PAAREN et al., 1980) kann dieser Metabolit künftig in größeren Mengen gewonnen werden. Das Interesse an $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ entstand vor allem durch eine Untersuchung von REEVE et al. (1978) an Vitamin D-mangelernährten Ratten. Während zwischen $25(\text{OH})\text{D}_3$ und diesem Metaboliten kein Unterschied bestand in der intestinalen Calciumabsorption und anderer Vitamin D-Wirkungen, zeigte er nur ca. 1/4 der Aktivität von $25(\text{OH})\text{D}_3$ bezüglich der Freisetzung von Calcium aus dem Knochen. Wenn sich diese Wirkung auch beim Menschen bestätigt, könnte $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ gegenüber dem entsprechenden Vitamin D_3 -Analogon bzw. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ beim Einsatz in der Behandlung von Krankheiten wie renaler Osteodystrophie Vorteile besitzen.

2.3 CALCINOGENE PFLANZEN

2.3.1 Übersicht

Weidetiere in verschiedenen Teilen der Welt werden von chronisch verlaufenden Krankheiten betroffen, die durch ein sehr ähnliches klinisches und pathologisch-anatomisches Erscheinungsbild sowie ihr enzootisches Auftreten gekennzeichnet sind. Auf Grund der Kalkablagerung im Weichgewebe der Tiere werden diese Krankheiten unter dem Begriff der Calcinose zusammengefaßt.

Die Symptomatik dieser Erkrankungen umfaßt Abmagerung, vermehrtes Liegen, Beeinträchtigung der Fruchtbarkeit und Leistungsrückgang, Bewegungsstörungen, erhöhte Puls- und Atemfrequenz sowie labordiagnostisch Hypercalcämie und Hyperphosphatämie. Je nach Ausmaß kann die Erkrankung bis zum Tod

der Tiere führen.

Pathologisch-anatomisch fallen vor allem ausgedehnte Verkalkungen des Endokards, der großen Gefäßstämme, der Lunge sowie der Sehnen und Bänder auf. Auch das Ausscheidungsorgan für Calcium und Phosphor, die Niere, ist frühzeitig von Kalkeinlagerungen betroffen und histologisch läßt sich eine Osteomyelosklerose feststellen.

Ein dem der Calcinose sehr ähnliches Krankheitsbild konnten erstmals KREITMAIR und MOLL (1928) an Ratten durch Verabreichung sehr hoher Dosen Vitamin D erzeugen. An Milchkühen wiesen SWAN et al. (1952) die toxischen Wirkungen einer D-Hypervitaminose nach.

Bis Mitte der sechziger Jahre wurde angenommen, daß die in Argentinien auftretende und von LIGNIERS (1898) beschriebene Krankheit "Enteque seco" durch eine ernährungsbedingte Imbalanz an Mineralstoffen verursacht wird, obwohl COLLIER (1927) schon erste Hinweise lieferte, daß die Pflanze *Solanum malacoxylon* (Syn. *Solanum glaucophyllum*) ursächlich an der Entstehung dieser Calcinose beteiligt ist. TILLEY (1967) stellte fest, daß in trockenen Gegenden das Auftreten der "Enteque seco" kaum, in wasserreichen Regionen dagegen gehäuft zu beobachten ist, was sich mit der botanischen Eigenschaft dieser Pflanze deckt, am Rande von Gewässern zu wachsen. Den endgültigen Beweis, daß *S. malacoxylon* die eigentliche Ursache der "Enteque seco" ist, lieferten WORKER und CARILLO (1967).

Für die in Brasilien bekannte Krankheit "Espichamento" (PARDI und DOS SANTOS, 1947) konnten DÖBEREINER et al. (1971) den Nachweis erbringen, daß dieser dieselbe Ätiologie zugrunde liegt.

Aber es wurden auch andere Solanaceenarten als Verursacher von enzootisch auftretenden Calcinosen ermittelt. *Solanum torvum* verursacht in Papua, Neu Guinea, diese Krankheit bei Rindern (MORRIS et al., 1979). *Cestrum diurnum* wird in Zu-

sammenhang gebracht mit einer bei Pferden und Rindern auftretenden Calcinose in Florida (KROOK et al., 1975). Daneben sind in Jamaica die "Manchester wasting disease" (ARNOLD, 1954) und in Hawaii die "Naalehu disease" (LYND et al., 1965) bekannt, die mit den beiden, oben beschriebenen Nachtschattengewächsen in Verbindung gebracht werden.

Bei enzootischen Calcinosen in Argentinien und Südafrika besteht der Verdacht, daß diese durch *Solanum verbascifolium* verursacht werden (RAMBECK und ZUCKER, 1982), in Australien sollen Früchte von *Solanum esuriale* Calcinosen auslösen (MC MENIMAN, 1976).

Eine den Gramineen zuzuordnende Pflanze, *Trisetum flavescens* (Goldhafer), wurde von DIRKSEN et al. (1972) als Ursache der im Voralpengebiet Bayerns und Österreichs vorkommenden "Enzootischen Calcinose" oder "Weidekrankheit" (DIRKSEN et al., 1970; KÖHLER und LIBISELLER, 1970) ermittelt.

Calcinosen in anderen Regionen sind ebenfalls beschrieben worden. Wodurch diese Krankheiten verursacht werden, konnte bisher aber noch nicht ermittelt werden (MORRIS, 1982).

2.3.2 Das Wirkprinzip von *Solanum malacoxylon*

Die Ähnlichkeit zwischen diesen calcinotischen Erkrankungen und den D-Hypervitaminosen deutete auch auf ein ähnliches pathophysiologisches Geschehen hin (CAPEN et al., 1966; HASS et al., 1958). Daher galten die Untersuchungen von *S. malacoxylon* vor allem der Isolierung des aktiven Prinzips der Pflanze sowie dem Vergleich mit Vitamin D und seinen Metaboliten.

HUMPHREYS (1973) stellte fest, daß die Wirksubstanz in *S. malacoxylon* in polaren Lösungsmitteln wie Wasser und Methanol löslich ist, was im Gegensatz zum Löslichkeitsverhalten von Vitamin D, $25(\text{OH})\text{D}_3$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ steht.

RUKSAN und CARILLO (1976) lieferten durch ihre Untersuchung Beweise dafür, daß die Wirksubstanz in *S. malacoxylon* durch gastrointestinale Enzyme verändert wird. Bei subcutaner und intravenöser Verabreichung des Wasserextraktes von *S. malacoxylon* zeigte dieser keine Aktivität. Dagegen waren sowohl der Wasserextrakt bei oraler Verabreichung, wie auch der mit Pansensaft inkubierte Wasserextrakt bei oraler, intravenöser und subcutaner Verabreichung bezüglich der Anhebung des Serumcalcium- und Serumphosphatspiegels wirksam. Hinweise, daß eine Vitamin D-metabolitartige Substanz in *S. malacoxylon* enthalten ist, welche die Hemmung der 1α -Hydroxylase in der Niere überwindet, erhielt WASSERMAN (1974) am Modell der strontiuminduzierten Rachitis am Hühnerküken. Trotz dieser Hemmung wurde die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -abhängige CaBP-Synthese durch *S. malacoxylon* induziert.

Der Nachweis, daß der aktive Faktor in *S. malacoxylon* mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ um das intestinale Rezeptorsystem konkurriert (PROCSAL et al., 1976), erhärteten die Befunde, daß die Wirksubstanz $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -ähnlichen Charakter besitzt.

WASSERMAN et al. (1976) konnten aus dem Wasserextrakt nach glykosidischer Spaltung eine lipophile Substanz extrahieren, die mittels gaschromatographisch-massenspektrometrischer Analyse als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ identifiziert wurde. Damit war der Beweis erbracht, daß in *S. malacoxylon* ein Glykosid von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vorliegt. Es ist aber noch nicht bekannt, an welchem C-Atom sich die Bindungsstelle befindet.

Der Nachweis des Anstieges des $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Plasmaspiegels durch Verabreichung von *S. malacoxylon*-Wasserextrakt gelang PETERLIK et al. (1976) an Vitamin D-depletierten Hühnerküken und am Modell der strontiuminduzierten Rachitis, sowie NAPOLI et al., (1977) und RAMBECK et al. (1983) an Vitamin D-mangelernährten Ratten.

Inzwischen wurde die Vitamin D_3 -25-Hydroxylase- und die $25(\text{OH})\text{D}_3$ - 1α -Hydroxylaseaktivität in den Zellmikrosomen der *S. malacoxylon*-Blätter, die 1α -Hydroxylaseaktivität auch in

den Mitochondrien nachgewiesen. Nach Inkubation mit β -Glykosidase wurden drei biologisch aktive Fraktionen isoliert und mittels Chromatographie und UV-Spektralanalyse als Vitamin D_3 , $25(OH)D_3$ und $1,25(OH)_2D_3$ identifiziert (ESPARAZA et al., 1982).

Die antirachitische Aktivität von *S. malacoxylon* wurde von RAMBECK und ZUCKER (1982) im von ZUCKER und GROPP (1968) entwickelten Wachteleischalentest bestimmt. Mit 170.000 IE Cholecalciferoläquivalenten ($4250 \mu g D_3$) pro kg Trockensubstanz entsprach die antirachitische Wirksamkeit größenordnungsmäßig dem von WASSERMAN et al. (1975) ermittelten Wert von 130.000 IE ($3250 \mu g D_3$) pro kg Trockensubstanz.

Auf der anderen Seite reichte bei erwachsenen Rindern schon die 5-malige Verabreichung von je 20 g getrockneter Blätter von *S. malacoxylon* an aufeinanderfolgenden Tagen, um schwere Verkalkungen zu erzeugen (KUNZ und HÄNICHEN, 1981). Dies wäre bei einer biologischen Wirksamkeit von *S. malacoxylon* entsprechend den in obigen Tests ermittelten Cholecalciferoläquivalenten von ca. 150.000 IE/kg Trockensubstanz nicht möglich, wenn Vitamin D in *S. malacoxylon* als Cholecalciferol und nicht als $1,25(OH)_2D_3$ -Glykosid vorliegen würde.

2.3.3 Vitamin D-artige Aktivität in *Trisetum flavescens*

Die Untersuchung von *T. flavescens* erfolgte entsprechend der von *S. malacoxylon*. Biologische Testsysteme wurden herangezogen, um die Aktivität von *T. flavescens* zu bestimmen, über Extrakterstellung wurde versucht, das aktive Prinzip des Goldhafers in Lösung zu bringen und genauer zu charakterisieren.

Während PAILER und RIEDL (1978) im Goldhafer verschiedene Phytosterole, nicht aber das Vitamin D_3 nachweisen konnten, gelang es ZUCKER et al., (1977) aus dem antirachitisch wirk-

samen Ätherextrakt des Goldhafers ein Steroid mit gleichen Retentionszeiten wie Vitamin D_3 zu isolieren. Die Suche nach $25(OH)D_3$ und $1,25(OH)_2D_3$ dagegen zeigte, daß diese Substanzen im Ätherextrakt nicht vorhanden waren (RAMBECK und ZUCKER, 1978). Mittels kombinierter gaschromatographisch-massenspektrometrischer Analyse konnte hingegen Vitamin D_3 in einer Konzentration von 4.000 IE ($100 \mu g D_3$) pro kg Trockensubstanz nachgewiesen werden (RAMBECK et al., 1979).

Da das Vitamin D_3 im Goldhafer zu 60 - 70 % in veresterter Form vorliegt (RAMBECK et al., 1981a) wurde in Bioassays an Hühnern, japanischen Wachteln und Ratten die biologische Wirksamkeit verschiedener Vitamin D_3 -Ester untersucht. In allen Fällen wiesen die Ester geringere Aktivität auf als das freie Vitamin D_3 (RAMBECK et al., 1981 b).

Die antirachitische Aktivität von Goldhafer in drei verschiedenen biologischen Testsystemen ergab im Vergleich zu Vitamin D_3 jeweils eine Wirksamkeit des Goldhafers von 3.000 - 4.000 IE Cholecalciferoläquivalenten pro kg Trockensubstanz (RAMBECK et al., 1981a; BITTNER, 1979), was gut mit den analytischen Werten übereinstimmt. Wenn Vitamin D in Goldhafer aber allein in nicht metabolisierter Form vorliegen würde, könnte man mit diesen Vitamin D_3 -Konzentrationen pro kg Trockensubstanz das Entstehen der "Enzootischen Calcinose" nicht erklären. Daß eine unterschiedliche Wirksamkeit verschiedener Goldhafersorten dabei eine Rolle spielen könnte, konnten RAMBECK et al. (1981a) ausschließen.

WASER et al., (1983) untersuchten die calcinogene Wirkung von Goldhafer im Vergleich zu Vitamin D_3 bei Schafen. Als Beurteilungskriterien wählten sie den Verkalkungsgrad von Herz, Aorta, Niere und Mesenterialgefäße. Dabei stellten sie ein ungefähres Wirkungsäquivalent von einem kg T. flavescens-Trockensubstanz zu 150.000 IE Vitamin D_3 fest.

Am Modell der strontiuminduzierten Rachitis beim Hühnerküken konnten PETERLIK et al. (1977) eine Erhöhung der intestinalen CaBP-Konzentration nach Verabreichung von *T. flavescens* beobachten. Demzufolge muß im Goldhafer auch eine Vitamin D-metabolitartig wirksame Substanz vorliegen, welche die 1α -Hydroxylasehemmung überwindet. Dies konnte durch Untersuchungen von ZUCKER und RAMBECK (1981) bestätigt werden. Nach Verabreichung von Ätherextraktrückstand erreichten sie am gleichen Versuchsmodell einen Anstieg der CaBP-Konzentration sowie eine Steigerung der Calcium- und Phosphatabsorption.

Weitere Untersuchungen von DIRKSEN et al. (1981) und RAMBECK und ZUCKER (1982) ergaben, daß in *T. flavescens* eine wasserlösliche Wirksubstanz vorliegt, womit das Löslichkeitsverhalten dieser Substanz genauer charakterisiert werden konnte.

Außerdem konnten RAMBECK et al. (1982) durch Inkubation des Ätherextraktrückstandes mit Pansensaft und β -Glykosidase eine Aktivitätssteigerung feststellen, was zusammen mit dem Löslichkeitsverhalten für eine ähnliche Wirksubstanz wie in *S. malaxocylon* spricht.

Nach chromatographischer Isolierung von zwei Vitamin D-wirksamen Fraktionen aus dem Wasserextrakt von *T. flavescens*, der einen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Wirkung, der anderen, die nur den Serumphosphatspiegel erhöhte (MORRIS und LEVAK, 1982), erhebt sich die Frage, ob in *T. flavescens* außer Vitamin D_3 und der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -wirksamen Komponente noch andere Wirksubstanzen eine Rolle spielen. Unter anderem könnten auch Vitamin D_2 -Metaboliten daran beteiligt sein, da RAMBECK (pers. Mitteilung) neben Vitamin D_3 auch geringe Mengen Vitamin D_2 in Goldhafer fand.

3. Eigene Untersuchungen

In einer fünf Versuche umfassenden biologischen Versuchsreihe mit Hühnerküken wurde vergleichend die Wirkung von Vitamin D_2 , Vitamin D_3 , den synthetischen Metaboliten $1,25(OH)_2D_3$, $1,25(OH)_2D_2$ und $24,25(OH)_2D_3$ auf verschiedene Vitamin D-abhängige Parameter untersucht. Desweiteren wurde in den Versuchen die metabolitartige Aktivität von *S. malaxocylon*, *T. flavescens* sowie von dessen Extrakten und Extraktrückständen mit der von $1,25(OH)_2D_3$ verglichen.

Gesundheitszustand, Gewichtsentwicklung, Serumstrontium und die spezifische Aktivität des CaBP der Dünndarmmukosa waren die Parameter, die untersucht wurden, wobei das Hauptaugenmerk auf der Bestimmung der CaBP-Aktivität lag.

3.1 VERSUCHSTIERE

Alle fünf Versuche wurden mit männlichen Mastküken (LOHMANN, B 975) durchgeführt, die sich auf Grund ihrer Masteigenschaften und der damit verbundenen Schnellwüchsigkeit besonders für Vitamin D-Mangelversuche eigneten. Ihr hoher Calciumbedarf führte schon nach wenigen Tagen bei Vitamin D-Depletion zu rachitischen Symptomen. Da die Untersuchung von PIKE et al. (1978) eine Wechselbeziehung zwischen Östrogenen und Vitamin D wahrscheinlich erscheinen läßt, wurden für die Versuche ausschließlich männliche Küken verwendet.

Tierhaltung

Die Versuchstiere wurden als Eintagsküken von der Brüterei bezogen. Während der gesamten Haltungsperiode wurden sie in einem fensterlosen Stall aufgezogen. Die Tierhaltung erfolg-

te in Kunststoffkäfigen (Grundfläche ca. 0,5 m², Höhe 30 cm), auf welche die Küken gleichmäßig verteilt wurden. Die Käfige waren an den beiden Längsseiten des Stalles in ca. 70 cm Höhe auf Holzgestellen aufgestellt, um annähernd gleiche Licht- und Temperaturverhältnisse zu erlangen. Beheizt wurde der Raum mit drei elektrischen Heizkörpern, welche die Temperatur in der ersten Woche auf 32°C, in der zweiten auf 30°C hielten. Die Beleuchtung erfolgte mittels fünf Leuchtstoffröhren (60 Watt) von der Decke aus. In die Käfige eingelegte Maschendrahtgitter sorgten für die Ansammlung der Exkremente auf dem mit einer Torfmulleinstreu bedeckten Boden der Käfige. Wasser erhielten die Küken mittels Stülptränken, Futter wurde in Kunststoffbehältnissen (37 x 7 cm) dargereicht. Beides stand den Tieren ad libitum zur Verfügung und wurde täglich erneuert.

3.2 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Die fünf Versuche waren einheitlich gegliedert. Einer jeweils achttägigen Vorperiode, die der Vitamin D-Depletion diente, folgte die eigentliche Versuchsperiode.

Vorperiode:

In der Vorperiode erhielten alle Tiere das in Tabelle 2 aufgeführte Vitamin D-freie Alleinfutter. Gegen Ende dieser Periode waren Anzeichen einer Rachitis zu erkennen, wie unsicherer Gang, gehäuftes Verharren in Hockstellung mit nach vorne ausgestreckten Ständern, sowie beginnende Zehenverkrümmungen. Vor Beginn der Versuchsperiode wurden die Küken mit Flügelmarken gekennzeichnet.

Versuchsperiode:

Die Dauer der Versuchsperiode betrug in den Versuchen I, II, IV und V jeweils 6 bzw. 7 Tage, im Versuch III aus betriebstechnischen Gründen 5 bzw. 6 Tage. Am Tag des eigentlichen Versuchsbeginns wurden die Tiere einzeln gewogen und Gewichtsklassen gebildet. Aus den mittleren Gewichtsklassen wurden die Versuchsgruppen mit annähernd gleichen Gesamtgewichten zusammengestellt, die Extremgewichtsklassen wurden aussortiert. Die Verteilung der Versuchsgruppen auf die Käfige erfolgte per Zufallsprinzip. Die Vitamin D-wirksamen Diätzusätze wurden in allen Versuchen ausschließlich über das Futter verabreicht. Am Versuchsende wurden die Küken gruppenweise einzeln gewogen und das Gewicht notiert. Anschließend wurde von jedem Tier Blut gewonnen. Nach der sofortigen Tötung der Tiere wurden ungefähr 10 cm Duodenum zur Darmschleimhautgewinnung entfernt.

3.3 FUTTER

Das Vorperiodenfutter bestand aus den in Tabelle 2 aufgeführten Komponenten und wurde in allen Versuchen in gleicher Zusammensetzung als Alleinfutter eingesetzt.

In der Versuchsperiode kamen zwei verschiedene, Vitamin D-freie Basaldiäten zum Einsatz. Tabelle 3 gibt die Inhaltsstoffe der Basaldiät I wieder, die Strontium zur Hemmung der 1α -Hydroxylase in der Niere enthielt. Bei Verabreichung dieser Diät wurde somit nur die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -artige Wirkung der Diätzusätze erfaßt. Diese Diät diente in Versuch I, II und III a als alleinige Grundmischung, in Versuch IV kam sie nur bei einem Teil der Gruppen zum Einsatz.

Die in Tabelle 4 aufgeführte Basaldiät II enthielt kein Strontium, um alle Vitamin D-wirksamen Substanzen, auch die nicht hydroxylierten, zu erfassen. Sie wurde in den Versuchen III b und V in allen, im Versuch IV in einem Teil der

Versuchsgruppen eingesetzt.

Die Kontrollgruppen erhielten während der Versuchsperiode die Basaldiät. Das Futter der Versuchsgruppen bestand aus der Basaldiät, in welche die jeweils zu untersuchenden Vitamin D-wirksamen Substanzen eingemischt waren. Dabei wurden Goldhafer und dessen Extraktrückstände jeweils zu Lasten des Maisstärkeanteils eingesetzt. In den Versuchen I und II wurde in den Rationen, die weder Goldhafer noch dessen Extraktrückstand erhielten, der gleiche Anteil Maisstärke durch Luzernegrünmehl ersetzt. Dies diente dazu, die Konsistenz und das Volumen des Futters den Goldhaferationen anzugleichen.

Tabelle 2

Vitamin D-freies Alleinfutter der Vorperiode
(0,99 % Ca; 0,52 % P)

Komponenten	%
Sojaschrot, fein	55,00
Native Maisstärke	31,26
Sojaöl, raff.	10,00
$\text{CaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	1,08
CaCO_3	1,50
NaCl	0,40
DL-Methionin	0,26
Vitamin- und Spurenelementvormischung ⁺	0,50
Gesamt	100,00

⁺ siehe Tabelle 5

Tabelle 3

Basaldiät I der Versuchsperiode
(0,4 % Ca; 1,32 % Sr; 0,51 % P)

Komponenten	%
Sojaschrot, fein	52,00
Sojaöl, raff.	9,00
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, reinst	1,00
CaCO_3	0,68
SrCO_3	2,20
DL-Methionin	0,25
Vitamin- und Spurenelementvormischung ⁺	0,50
Native Maisstärke	ad 100,00
Gesamt	100,00

⁺ siehe Tabelle 5

Tabelle 4

Basaldiät II der Versuchsperiode

(1 % Ca; 0,51 % P)

Komponenten	%
Sojaschrot, fein	52,00
Sojaöl, raff.	9,00
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, reinst	1,00
CaCO_3	2,18
DL-Methionin	0,25
Vitamin- und Spurenelementvormischung ⁺	0,50
Native Maisstärke	ad 100,00
Gesamt	100,00

⁺ siehe Tabelle 5

Tabelle 5

Vitamin-und Spurenelementvormischung

Menge, für den Zusatz zu einem kg Futter,
bei einem Anteil von 0,5 % an der Diät.

Komponenten		
Retinol	(Vit. A)	1,50 mg
Thiamin	(Vit. B ₁)	2,00 mg
Nicotinsäure	(Vit. B ₂)	40,00 mg
Ca-Pantothenat	(Vit. B ₂)	12,00 mg
Riboflavin	(Vit. B ₂)	4,00 mg
Pyridoxin	(Vit. B ₆)	2,00 mg
Cyanocobalamin	(Vit. B ₁₂)	0,02 mg
α-DL-Tocopherolacetat	(Vit. E)	120,00 mg
Vitamin K ₃		1,00 mg
Cholinchlorid		1500,00 mg
Fe-Fumarat		100,00 mg
MnSO ₄ x H ₂ O		200,00 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O		200,00 mg
Sojafeinmehl		ad 5000,00 mg

3.4 VITAMIN D-WIRKSAME DIÄTZUSÄTZE

Goldhafer (*Trisetum flavescens*)

Der eingesetzte Goldhafer stammte vom Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim der Tierärztlichen Fakultät der Universität München. Er wurde dort als Monokultur der Sorte 'Triset 51' angebaut.

In den Versuchen wurde Goldhafer der Ernten 16. September 1982 und 31. Mai 1983 eingesetzt. Sofort nach der Ernte wurde der Goldhafer bei -20°C tiefgefroren, kurz vor Versuchsbeginn lyophilisiert und gemahlen und in dieser Form ins Futter eingemischt.

Ätherextraktion und Äthanolextraktion

100 g Goldhafer wurden in lyophilisiertem und gemahlenem Zustand mit 500 ml Äther versetzt. Nach 16-stündiger Inkubation, in der die ätherlöslichen Inhaltsstoffe aus dem Goldhafer extrahiert wurden, wurde der Äther abfiltriert und der Extrakt rückstand bis zur Entfärbung nachgewaschen. Der Extrakt wurde anschließend im Vakuumrotationsverdampfer eingengt und auf dem Wasserbad in den Sojaschrotanteil des Futters eingemischt. Der bei der Extraktion anfallende Rückstand wurde unter dem Abzug getrocknet und ebenfalls ins Futter eingemischt.

In gleicher Weise wurden Äthanolextrakt und Äthanolextrakt-rückstand hergestellt und in das Futter eingemischt.

Methanol - Chloroformextraktion

100 g Goldhafer wurden mit 500 ml eines Gemisches aus zwei Volumenteilen Methanol und einem Volumenteil Chloroform versetzt. Anschließend wurde gleich verfahren wie bei der Herstellung des Ätherextraktes.

Zur Herstellung der Methanol-Chloroformextrakte vom Ätherextrakt rückstand bzw. Äthanolextrakt rückstand wurden in einer ersten Extraktion die äther- bzw. äthanollöslichen Inhaltsstoffe des Goldhafers entfernt. Anschließend wurde die eigentliche Extraktion mit dem Methanol-Chloroformgemisch durchgeführt. Auch hier wurde zur weiteren Aufbereitung dasselbe Verfahren wie bei der Herstellung des Ätherextraktes angewendet.

Solanum malacoxylon

S. malacoxylon wurde uns freundlicherweise von der Firma Lohmann Tierernährung GmbH, Cuxhaven, in getrockneter und gemahlener Form zur Verfügung gestellt. Es wurde ohne weitere Behandlung in das Futter eingemischt.

Vitamin D₃, Vitamin D₂ und Vitamin D-Metaboliten

Verwendet wurde Vitamin D₃, kristallin (Firma Merck, Art.-Nr. 500 936) 1 µg = 40 IE und Vitamin D₂, kristallin (Firma Merck, Art.-Nr. 500 917).

Die synthetischen Metaboliten 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25(OH)₂D₃), 1,25-Dihydroxyergocalciferol (1,25(OH)₂D₂) und 24,25-Dihydroxycholecalciferol (24,25(OH)₂D₃) wurden uns für die Versuche freundlicherweise von Dr. W. Meier, Firma Hoffmann-La Roche AG, Basel, zur Verfügung gestellt.

Vitamin D₃, Vitamin D₂ und die Vitamin D-Metaboliten wurden in Äthanol gelöst und in Bezug zu Vitamin D₃ äquimolar in

die Diäten eingemischt. Dazu wurde der Sojaschrotanteil der jeweiligen Ration mit Diäthyläther befeuchtet und die benötigte Menge der in Äthanol gelösten Substanzen zugemischt. Die Trocknung erfolgte auf dem Wasserbad unter dauernder Durchmischung.

3.5 PROBENNAHME UND BESTIMMUNGSMETHODEN

Gesundheitszustand und Gewichtsentwicklung

Das Allgemeinbefinden der Tiere wurde über die gesamte Hal-
tungsperiode beobachtet. Gesundheitszustand und auftretende
klinische Symptome wurden schriftlich festgehalten. Zu Ver-
suchsbeginn und am Versuchsende wurden die Küken einzeln
gewogen. Die Angabe der Gewichtsentwicklung erfolgte in g
Gewichtszunahme pro Tier und Tag.

Serumgewinnung

Den Küken wurde am Versuchsende die rechte Jugularvene mit-
tels Skalpellschnitt eröffnet. In Serumröhrchen, die gerin-
nungsförderndes Granulat enthielten, wurde pro Küken 5-8 ml
Blut gewonnen. Anschließend erfolgte die Tötung der Tiere
per Genickschlag. Die Blutproben wurden nach der Gerinnungs-
zeit für 10 min bei 1.200 x g zentrifugiert, anschließend
das überstehende Serum mit Pasteurpipetten abpipettiert. Bis
zur Bestimmung des Strontiums wurde das Serum tiefgefroren
bei -20°C aufbewahrt.

Serumstrontiumbestimmung

Die Bestimmung der Serumstrontiumwerte erfolgte als Einzelbestimmung mittels Atomabsorptionsspektrometrie (Atomabsorptionsspektrometer M4 QIII/FA2, Firma Carl Zeiss).

Die Serumproben wurden mit 1%-iger Lanthanlösung (La_2O_3 gelöst in aqua dest.) im Verhältnis 1 Teil Serum zu 9 Teilen Lanthanlösung verdünnt. Dies diente der Ausschaltung von Querstörungen. Die so erhaltenen Proben wurden gegen Vergleichslösungen, die Strontium als $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ in einer Konzentration von 5 ppm und 10 ppm enthielten, gemessen. Es wurde mit einer Wellenlänge von 460,73 nm, einer Spaltbreite von 0,035 mm, einem Hohlkathodenstrom von 10 mA und Acetylen als Brenngas gearbeitet. Die Leerwertbestimmung erfolgte mit 1 %-iger Lanthanlösung.

Calciumbindendes Protein (CaBP)

Der heute vielleicht am besten definierte molekulare Ausdruck der Vitamin D-Wirkung ist die Induktion des CaBP durch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (WASSERMAN and FULLMER, 1983). So ist die Bestimmung des CaBP bzw. dessen Aktivitätsbestimmung als Parameter für die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -artige Wirkung Vitamin D-wirksamer Substanzen am Darm heute allgemein gebräuchlich.

WASSERMAN und TAYLOR (1974) und MUSSER et al. (1977) stellten fest, daß die Bestimmung der CaBP-Aktivität im Chelex-Versuch als Maß für die duodenale, Vitamin D-abhängige CaBP-Bildung geeignet ist. Eine lineare Beziehung zwischen CaBP-Konzentration und CaBP-Bindungsaktivität wurde schon früher entdeckt (WASSERMAN et al., 1968). NITSCHKE (1980) kam bei seinen Untersuchungen an Hühnerküken zu dem Ergebnis, daß der Parameter CaBP-Aktivität, gemessen im Chelex-Versuch, die Vitamin D-Wirkung empfindlicher wiedergibt als andere Parameter, wie Serumphosphat, Serumstrontium und Serumcalcium. Insbesondere die Strontiumhemmung spiegelte sich in der Messung der CaBP-Aktivität eindeutig wider.

Herstellung des Schleimhauthomogenats

Die Herstellung des Schleimhauthomogenats wurde nach der Methode von CORRADINO und WASSERMAN (1971) durchgeführt. Hierzu wurde den Küken sofort nach dem Töten der absteigende Schenkel des Duodenums (a. 10 cm lang) entnommen. Anschließend wurde das Duodenumstück in eisgekühlter, physiologischer Kochsalzlösung gespült, entlang des Gekröseansatzes aufgeschnitten, nochmals gespült und die Restflüssigkeit abgestreift. Das Abkratzen der Mukosa erfolgte mit Hilfe eines Objektträgers auf glatter Unterlage. Sofort danach wurde die Schleimhaut gewogen. Das Gewicht der Mukosa mit 6 multipliziert ergab die zuzusetzende Menge an eisgekühlter Trispuferlösung (0,2m; pH 7,4) in Volumeneinheiten (ml).

Die Homogenisierung erfolgte mit einem Homogenisatorzylinder (5 ml) und dem dazugehörenden Teflonkolben (B. Braun, Melsungen AG). Das so erhaltene Homogenat wurde 20 min. lang bei 38.000 x g und 3°C zentrifugiert und danach der Überstand bei 60°C 12 min. lang im Wasserbad erhitzt. Durch eine weitere Zentrifugation (10 min, 1.200 x g) erfolgte die Abtrennung der hitzelabilen, ausgefällten Proteine. Das hitzestabile CaBP wurde durch diese Behandlung nicht zerstört (TAYLOR and WASSERMAN, 1965), es befand sich weiterhin im Überstand gelöst. Dieser klare Überstand, im folgenden als Homogenat bezeichnet, wurde bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt.

Die CaBP-Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der CaBP-Aktivität erfolgte nach der Methode von WASSERMAN und TAYLOR (1966) in abgewandelter Form. Das Prinzip beruht auf der Konkurrenz zwischen dem CaBP und einem Kationenaustauscherharz (Chelex 100, Bio Rad Laboratories, 200 - 400 mesh), um eine bestimmte Menge radioaktiv markierten Calciums.

Erst wurde 1 ml Homogenat mit 0,5 ml einer Chelex-Trispuffer-Suspension versetzt (4,5 g Chelex/ 25 ml Trispuffer). Anschließend - nach kurzem Durchmischen beider Lösungen - wurden 0,1 ml einer $^{45}\text{CaCl}_2$ -Lösung (Amersham, 1 mCi/200 ml Trispuffer) zugegeben und das Ganze 15 sec. lang auf einem Vortexgerät vermenget. Durch Zentrifugation (10 min., 1.600 x g) erfolgte dann die Abtrennung des Austauscherharzes. Vom Überstand wurden 0,2 ml in ein mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Unisolve I, Zinsser) gefülltes Zählfläschchen pipetiert, danach wurden beide Lösungen vermenget. Die Bestimmung der Radioaktivität der so erhaltenen Probe erfolgte mit einem β -Szintillationszähler (Flüssigkeitsszintillationszähler Packard TRI-CARB, Mod. 3385). Zur Bestimmung der jeder Probe zugesetzten Gesamtradioaktivität wurden in drei Zählfläschchen statt 0,2 ml Überstand jeweils 0,1 ml $^{45}\text{CaCl}_2$ -Lösung, 0,1 ml aqua dest. und 10 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben. Nach der Messung wurde aus diesen drei Werten der Mittelwert errechnet.

Als Maß für die spezifische Aktivität des CaBP wurde ermittelt, wieviel Prozent Radioaktivität, bezogen auf die zugesetzte Gesamtradioaktivität, sich in den einzelnen Proben befanden. Anschließend wurde der erhaltene Wert durch den Proteingehalt der Probe dividiert (TAYLOR and WASSERMAN, 1967).

Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Homogenatproteins erfolgt nach LOWRY et al. (1951). Hierzu wurde 1 Teil Homogenat mit 50 Teilen aqua dest. verdünnt. 1 ml dieser Verdünnung wurde mit 2,5 ml einer Lösung E vermenget, die sich aus 50 Teilen Lösung A (2 %-ige Na_2CO_3 -Lösung in 0,1 n NaOH, Natriumcarbonat wasserfrei), 0,5 Teilen Lösung B (0,5 %-ige CuSO_4 -Lösung, $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$) und 0,5 Teilen Lösung C (50 Teile Lösung A und 1 Teil Lösung B) zusammensetzte. 10 min. später wurde 1 ml Folin

Reagenz (1 Teil Folin-Ciocalteus, Phenolreagenz, Merck 9001 und 2 Teile aqua dest.) zugesetzt und kräftig geschüttelt. Nach genau 60 min. wurden die Proben bei 750 nm mit einem Photometer der Firma Carl Zeiss (PM QII) gegen einen in gleicher Weise behandelten Leerwert, der statt der Homogenatverdünnung aqua dest. enthielt, gemessen. Anhand einer Eichkurve, die mit Serum-Albumin (BSA, Fraktion V, Sigma, A 4503) in einem Konzentrationsbereich von 2,5 - 20 mg/100 ml erstellt wurde, erfolgte die Proteinbestimmung.

4. Versuchsbeschreibung und Ergebnisse

4.1 VERSUCH I

Im ersten Versuch sollte am Modell der strontiuminduzierten Rachitis die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -artige Aktivität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, S. malacoxylon und Goldhafer verglichen werden. Desweiteren wurden in diesem Versuch Extrakte und Extraktückstände von Goldhafer eingesetzt, um das Löslichkeitsverhalten der im Goldhafer vorhandenen metabolitartig wirksamen Substanz(en) näher charakterisieren zu können.

Als Kontrolle diente eine Vitamin D-frei ernährte Versuchsgruppe. Zur Überprüfung der Hemmwirkung von Strontium auf die 1α -Hydroxylase in der Niere enthielt eine weitere Kontrollgruppe 20 μg Vitamin D_3 pro kg Futter. Als allgemeine Parameter wurden Gesundheitszustand und Gewichtsentwicklung, als Parameter einer spezifischen Vitamin D-Wirkung die spezifische CaBP-Aktivität in der Dünndarmmukosa gewählt.

Ergebnisse

Schon während der Vitamin D-Depletion der Vorperiode zeigten die Hühnerküken Symptome einer Rachitis, wie unsicherer Gang, häufiges Verharren in Hockstellung mit nach vorne ausgestreckten Ständern und beginnende Zehenverkrümmungen.

In der Versuchsperiode verstärken sich diese Symptome. Bedingt durch die dauernde Hockstellung entwickeln sich Druckstellen an den Tarsalgelenken und am Bauch. Das Gefieder wird struppig, die Tarsalgelenke sind teilweise verdickt und die für die Rachitis typischen Zehenverkrümmungen werden deutlich sichtbar. Zunehmend schwankender Gang und gehäuftes Einnehmen der Seitenlage vervollständigen das klinische Krankheitsbild. Die Aufnahme von Strontium führt zur Strontiumintoxikation, was den Gesundheitszustand weiter ver-

schlechtert. Dies wirkt sich vor allem bei den Gruppen aus, die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -wirksame Metaboliten erhalten, da diese Metaboliten die Strontiumresorption steigern.

Eine Differenzierung zwischen den einzelnen Gruppen bezüglich des Gesundheitszustandes ist deshalb nicht möglich.

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich ist, bewirkt 1 g S. malacoxylon die größte Gewichtszunahme, gefolgt von der Vitamin D-frei ernährten Kontrollgruppe. Bei den Gruppen die höhere S. malacoxylonkonzentrationen erhielten, fallen die Werte wieder ab. Durch $2,2 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, 2 g S. malacoxylon sowie den Methanol-Chloroformextrakt vom Ätherextraktrückstand werden ungefähr gleiche mittlere Gewichtszunahmen erreicht. 0,5 g S. malacoxylon und der Ätherextrakt von Goldhafer liegen bezüglich der Gewichtszunahme zwischen $2,2 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und 1 g S. malacoxylon. Goldhafer selbst sowie dessen Extraktrückstände erzeugen deutlich niedrigere Gewichtszunahmen.

Der Parameter spezifische CaBP-Aktivität ist in Tabelle 7 aufgeführt. Die Kontrollgruppe weist die geringste CaBP-Aktivität in der Dünndarmmukosa auf. $20 \mu\text{g}$ Vitamin D_3 bewirken nur einen geringen Anstieg um ca. 30 %. $2,2 \mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und 2 g S. malacoxylon lassen die CaBP-Aktivität auf den 4-fachen Wert der Kontrollgruppe ansteigen. Der Wert für Goldhafer liegt im Bereich von 0,5 g S. malacoxylon. Aber auch die übrigen Goldhafergruppen liegen in demselben Bereich und damit deutlich über der Kontrollgruppe. Der Vergleich zwischen Methanol-Chloroformextrakt und Methanol-Chloroformextraktrückstand deutet an, daß im Extrakt der größere Anteil an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -artiger Aktivität vorhanden ist. Die größte CaBP-Aktivität erzeugen 4 g S. malacoxylon. Die steigenden S. malacoxylonmengen pro kg Futter bewirken einen konzentrationsabhängigen Anstieg der CaBP-Aktivität im eingesetzten Konzentrationsbereich.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen, daß durch Strontium eine Hemmung der Vitamin D-artigen Wirkung erzeugt werden kann. Der Parameter Gesundheitszustand ist in diesem Modell nicht, der Parameter Gewichtsentwicklung im Vergleich zum Parameter CaBP-Aktivität nur bedingt aussagekräftig.

Der hier eingesetzte Goldhafer zeigt die ungefähr gleiche $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -artige Aktivität wie 0,5 g S. malacoxylon, 2,2 μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ die gleiche wie 2 g S. malacoxylon.

In allen Extrakten und Extrakt rückständen von Goldhafer ist Vitamin D_3 -metabolitartige Aktivität vorhanden.

Zwischen S. malacoxylonkonzentration und CaBP-Aktivität besteht eine positiv korrelierte Beziehung.

Tabelle 6
Versuch I

Basaldiät I: 1,32 % Sr
(n = 10)

Gewichtsentwicklung⁺

Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
D-freie Kontrolle	13,3	3,0
20 µg Vitamin D ₃	12,3	3,3
2,2 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	11,3	1,7
0,5 g S. malacoxylon	12,5	2,8
1,0 g S. malacoxylon	14,1	1,9
2,0 g S. malacoxylon	11,1	2,0
4,0 g S. malacoxylon	11,7	3,6
200 g Goldhafer (16.9.82)	10,0	3,2
Ätherextrakt von 200 g Goldhafer	12,6	4,1
Ätherextraktrückstand von 200 g Goldhafer	10,3	3,7
Methanol-Chloroformextrakt vom ÄER von 200 g Goldhafer	11,4	4,0
Methanol-Chloroformextraktrückstand vom ÄER von 200 g Goldhafer	8,1	3,1

⁺ Angabe in g Gewichtszunahme pro Tier und Tag

Tabelle 7.

Versuch I

Basaldiät I: 1,32 % Sr

(n = 10)

CaBP in der Dünndarmmukosa⁺

Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
D-freie Kontrolle	1,14	0,85
20 µg Vitamin D ₃	1,58	1,03
2,2 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	4,62	1,14
0,5 g S. malacoxylon	2,53	0,38
1,0 g S. malacoxylon	3,44	1,13
2,0 g S. malacoxylon	4,58	1,42
4,0 g S. malacoxylon	6,70	1,10
200 g Goldhafer (16.9.82)	2,70	0,69
Ätherextrakt von 200 g Goldhafer	2,66	0,47
Ätherextraktrückstand von 200 g Goldhafer	2,30	0,64
Methanol-Chloroformextrakt vom ÄER von 200 g Goldhafer	2,48	0,75
Methanol-Chloroformextraktrückstand vom ÄER von 200 g Goldhafer	2,01	0,49

⁺ % Radioaktivität im Überstand, bezogen auf die Gesamtra-
dioaktivität, pro mg Gesamtprotein der Probe

4.2 VERSUCH II

Nachdem im ersten Versuch die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -artige Aktivität von Goldhafer und seinen Aufbereitungsformen untersucht worden war, sollten im 2. Versuch die erhaltenen Ergebnisse am gleichen Versuchsmodell kontrolliert werden. Mit dem Einsatz von Äthanolextrakt und Äthanolextraktrückstand wurde das Verhalten der metabolitartig wirksamen Substanz(en) bezüglich eines weiteren Lösungsmittel untersucht. Desweiteren sollte erstmalig ein synthetisch hergestellter Metabolit von Vitamin D_2 , das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ auf seine metabolitartige Wirksamkeit im Vergleich zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ untersucht werden. Beide Substanzen wurden in äquimolaren Mengen in jeweils 4 Versuchsgruppen eingesetzt.

Ergebnisse

Goldhafer und Goldhaferextraktrückstände bewirken wie im ersten Versuch gegenüber der Kontrolle verminderte Gewichtszunahmen, mit Ausnahme des Äthanolextraktrückstand, wie in Tabelle 8 ersichtlich ist. Demgegenüber wird durch die Goldhaferextrakte gegenüber der Kontrolle eine deutliche Steigerung der Gewichtszunahme erreicht. Da die Äthanolextraktgruppe während den ersten zwei Versuchstagen kaum Futter aufnahm, muß der Wert dieser Gruppe unberücksichtigt bleiben. Die höchste Zunahme wird durch Verabreichung der Methanol-Chloroformextrakte erzielt. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ steigern ebenfalls die Gewichtszunahme gegenüber der Kontrolle, eine Dosisabhängigkeit ist dabei nicht ersichtlich.

Wie Tabelle 9 zeigt, wird im 2. Versuch durch Verabreichung von Goldhafer gegenüber der Kontrolle nur ein geringer Anstieg der CaBP-Aktivität erzielt, aber auch Ätherextrakt und Ätherextraktrückstand bewirken die gleiche Steigerung. Der Methanol-Chloroformextrakt vom Ätherextraktrückstand von 200 g Goldhafer scheint dagegen keine metabolitartige Aktivität zu enthalten, die doppelte Menge pro kg Futter läßt die CaBP-Aktivität aber deutlich ansteigen. Der Äthanolextrakt bewirkt von allen Goldhafergruppen die größte Steigerung der CaBP-Aktivität. 20 µg Vitamin D_3 erzeugen, wie erwartet, nur einen geringen Anstieg der CaBP-Aktivität. Bei den $1,25(OH)_2D_3$ -Gruppen ist eine dosisabhängige Steigerung der CaBP-Aktivität ersichtlich. Die Beziehung ist linear, die Korrelation der errechneten Regressionsgeraden beträgt 0,99. Die größte $1,25(OH)_2D_3$ -Konzentration bewirkt eine Steigerung der CaBP-Aktivität auf das 4,75-fache des Kontrollwertes. Demgegenüber wird durch die gleiche $1,25(OH)_2D_2$ -Menge pro kg Futter nur eine Steigerung um ca. 40 % erzielt. Der Vergleich mit der Regressionsgeraden von $1,25(OH)_2D_3$ ergibt, daß 4,5 µg $1,25(OH)_2D_2$ die gleiche Wirksamkeit besitzen wie ca. 0,55 µg $1,25(OH)_2D_3$.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der eingesetzte Goldhafer nur geringe metabolitartige Aktivität zeigt, die aber auch im Ätherextrakt und Ätherextraktrückstand vorhanden ist.

In Äthanol scheinen sich die metabolitartig wirksamen Substanzen des Goldhafers am besten zu lösen.

Die Abhängigkeit des Parameters CaBP-Aktivität von der $1,25(OH)_2D_3$ -Konzentration ergibt eine lineare Beziehung. Der $1,25$ -Dihydroxymetabolit von Vitamin D_2 zeigt gegenüber $1,25(OH)_2D_3$ geringere Wirksamkeit bezüglich der Induktion der CaBP-Synthese.

Tabelle 8
Versuch II

Basaldiät I: 1,32 % Sr
(n = 10)

Gewichtsentwicklung⁺

Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
D-freie Kontrolle	9,8	2,6
200 g Goldhafer (16.9.1982)	9,4	2,4
Ätherextrakt von 200 g Goldhafer	11,8	1,8
Ätherextraktrückstand von 200 g Goldhafer	8,7	2,0
Methanol-Chloroformextrakt vom ÄER von 200 g Goldhafer	12,5	2,1
Methanol-Chloroformextraktrückstand vom ÄER von 200 g Goldhafer	9,0	2,3
Äthanolextrakt von 200 g Goldhafer	8,7	1,9
Äthanolextraktrückstand von 200 g Goldhafer	10,9	2,8
Methanol-Chloroformextrakt v. Äthanol-ER v. 200 g Goldhafer	12,5	2,6
Methanol-Chloroformextraktrückstand v. Äthanol-ER v. 200 g Goldhafer	7,6	3,0
Methanol-Chloroformextrakt vom ÄER von 400 g Goldhafer	11,6	2,7
20 µg Vitamin D ₃	12,4	2,2
1,1 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	11,7	2,2
1,65 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	11,0	1,9
2,2 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	11,6	2,2
4,4 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	11,7	1,3
1,1 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	12,1	2,3
1,7 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	11,7	2,8
2,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	11,0	2,5
4,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	11,5	2,9

⁺ Angabe in g Gewichtszunahme pro Tier und Tag

Tabelle 9
Versuch II

Basaldiät I: 1,32 % Sr
(n = 10)

CaBP in der Dünndarmmukosa⁺

Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
D-freie Kontrolle	1,28	0,32
200 g Goldhafer (16.9.1982)	1,52	0,32
Ätherextrakt von 200 g Goldhafer	1,52	0,24
Ätherextraktrückstand von 200 g Goldhafer	1,52	0,32
Methanol-Chloroformextrakt vom ÄER von 200 g Goldhafer	1,28	0,32
Methanol-Chloroformextraktrückstand vom ÄER von 200 g Goldhafer	1,20	0,16
Äthanolextrakt von 200 g Goldhafer	2,00	0,48
Äthanolextraktrückstand von 200 g Goldhafer	1,36	0,24
Methanol-Chloroformextrakt v. Äthanol-ER v. 200 g Goldhafer	1,12	0,16
Methanol-Chloroformextraktrückstand v. Äthanol-ER v. 200 g Goldhafer	1,44	0,56
Methanol-Chloroformextrakt vom ÄER von 400 g Goldhafer	1,76	0,32
20 µg Vitamin D ₃	1,44	0,32
1,1 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	2,16	0,48
1,65 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	2,64	0,80
2,2 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	3,84	0,96
4,4 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	6,08	1,12
1,1 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	1,28	0,08
1,7 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	1,60	0,64
2,25 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	1,52	0,48
4,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	1,78	0,56

⁺ % Radioaktivität im Überstand, bezogen auf die Gesamtra-
dioaktivität, pro mg Gesamtprotein der Probe

4.3 VERSUCH III A

Der zweite Versuch hatte gezeigt, daß der 1,25-Dihydroxymetabolit von Vitamin D_2 biologische Aktivität besitzt, die aber im Vergleich zu der von $1,25(OH)_2D_3$ wesentlich geringer ist. Um die genaue Relation der Vitamin D-metabolitartigen Aktivität von $1,25(OH)_2D_2$ im Vergleich zu $1,25(OH)_2D_3$ zu bestimmen, wurde in diesem Versuch in drei Versuchsgruppenpaaren $1,25(OH)_2D_3$ und die jeweils 8-fache äquimolare Menge $1,25(OH)_2D_2$ eingesetzt. Da die metabolitartige Aktivität von Goldhafer in Versuch I und II unterschiedlich groß war, sollte diese im Versuch III durch Einsatz von Goldhafer der gleichen Ernte nochmals überprüft werden. Vitamin D_3 und Vitamin D_2 wurden in äquimolaren Mengen eingesetzt um zu untersuchen, ob die Hemmwirkung von Strontium auf die 1α -Hydroxylase auch die Vitamin D_2 -Wirkung beeinflußt. Als weiterer Parameter für die $1,25(OH)_2D_3$ -artige Wirkung wurde in diesem Versuch zusätzlich das Serumstrontium bestimmt.

Ergebnisse

Die Tabelle 10 zeigt, daß Vitamin D_3 bezüglich der Gewichtszunahme keine Wirksamkeit aufweist, demgegenüber kann die gleiche äquimolare Menge Vitamin D_2 eine Steigerung gegenüber der Kontrolle erzeugen. Bei den $1,25(OH)_2D_2$ -Gruppen läßt die kleinste Dosis die Gewichtszunahme auf den höchsten Wert steigen, die höheren Konzentrationen bewirken eine geringere Zunahme. Ein Anstieg der Zunahme ist auch bei den $1,25(OH)_2D_3$ -Gruppen zu beobachten. Hier ist es die mittlere Konzentration, welche die größte Wirksamkeit bezüglich dieses Parameters zeigt. Goldhafer bewirkt die geringste Zunahme, die unter dem Kontrollwert liegt.

Aus Tabelle 11 ist ersichtlich, daß 20 µg Vitamin D₃ eine CaBP-Aktivitätssteigerung um ca. 35 % gegenüber dem Kontrollwert erzeugen. Die gleiche äquimolare Menge Vitamin D₂ besitzt einen geringeren Effekt bezüglich der Steigerung der CaBP-Aktivität. Goldhafer läßt die CaBP-Aktivität auf einen Wert zwischen 1,1 und 2,2 µg 1,25(OH)₂D₃ steigen. Die 1,25(OH)₂D₃- und 1,25(OH)₂D₂-Gruppen bewirken einen dosisabhängigen Anstieg der CaBP-Aktivität. Außer bei der mittleren Dosis liegen die Werte für 1,25(OH)₂D₂ über den entsprechenden 1,25(OH)₂D₃-Werten. Die Korrelation der Regressionsgeraden für 1,25(OH)₂D₃ beträgt unter Einbeziehung des Kontrollwertes 0,99.

Die Serumstrontiumwerte sind in Tabelle 12 aufgeführt. Wie bei der Gewichtsentwicklung sind auch hier nur Tendenzen abzulesen. 18 µg 1,25(OH)₂D₂ erzeugen wie bei der CaBP-Aktivität auch bei diesem Parameter den höchsten Wert und innerhalb der 1,25(OH)₂D₂-Gruppen ist die Tendenz einer dosisabhängigen Steigerung der Serumstrontiumkonzentration zu erkennen. 2,2 µg 1,25(OH)₂D₃ lassen den Serumstrontiumspiegel gegenüber den beiden niedrigeren Konzentrationen ebenfalls ansteigen.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß der eingesetzte Goldhafer eine metabolitartige Aktivität von 1,1 - 2,2 µg 1,25(OH)₂D₃ besitzt. Die 8-fachen äquimolaren Mengen von 1,25(OH)₂D₂ bewirken im Modell der strontiuminduzierten Rachitis mindestens die gleiche CaBP-Aktivitätssteigerung wie die entsprechenden 1,25(OH)₂D₃-Konzentrationen.

Tabelle 10
Versuch III a

Basaldiät I: 1,32 % Sr
(n = 10)

Gewichtsentwicklung⁺

Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
D-freie Kontrolle	9,4	4,2
20 µg Vitamin D ₃	9,4	3,0
20,7 µg Vitamin D ₂	10,5	2,4
4,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	11,8	2,4
9,0 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	10,3	1,5
18,0 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	10,6	2,3
0,55 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	10,6	3,4
1,1 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	11,3	2,3
2,2 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	10,1	1,7
200 g Goldhafer (16.9.1982)	8,7	3,4

⁺ Angabe in g Gewichtszunahme pro Tier und Tag

Tabelle 11
Versuch III a

Basaldiät I: 1,32 % Sr
(n = 10)

CaBP in der Dünndarmmukosa⁺

Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
D-freie Kontrolle	1,18	0,41
20 µg Vitamin D ₃	1,55	0,64
20,7 µg Vitamin D ₂	1,37	0,16
4,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	1,52	0,27
9,0 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	1,74	0,71
18,0 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	4,02	1,12
0,55 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	1,44	0,16
1,1 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	1,87	0,36
2,2 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	2,63	0,70
200 g Goldhafer (16.9.1982)	2,37	0,58

⁺ % Radioaktivität im Überstand, bezogen auf die Gesamtra-
dioaktivität, pro mg Gesamtprotein der Probe

Tabelle 12
Versuch III a

Basaldiät I: 1,32 % Sr
(n = 10)

Serumstrontium
Angabe in mmol/l

Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
D-freie Kontrolle	0,75	0,20
20 µg Vitamin D ₃	0,72	0,13
20,7 µg Vitamin D ₂	0,81	0,15
4,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	0,69	0,17
9,0 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	0,70	0,13
18,0 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	0,87	0,11
0,55 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,66	0,08
1,1 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,63	0,15
2,2 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,72	0,11
200 g Goldhafer (16.9.1982)	0,55	0,12

4.4 VERSUCH III b

Unter Verwendung des Vitamin D-depletierten Rachitismodells sollten in diesem Versuch dieselben Substanzen in gleicher Konzentration wie in Versuch III a untersucht werden. Mit diesem Modell besitzt man die Möglichkeit, die gesamte Vitamin D-artige, antirachitische Aktivität der einzelnen Diätzusätze zu erfassen. Damit wird ein Vergleich der Vitamin D-artigen Aktivität von Vitamin D_3 mit der von Vitamin D_2 und von Goldhafer möglich. Außerdem sollte überprüft werden, ob sich $1,25(OH)_2D_2$ in diesem Versuchsmodell genauso verhält wie im Modell der strontiuminduzierten Rachitis.

Ergebnisse

Während die Kontrolltiere und die Vitamin D_2 -Gruppe auch am Versuchsende noch die typischen Symptome einer Rachitis aufweisen, sind in allen anderen Gruppen nur noch vereinzelt Tiere vorhanden, bei denen diese Krankheitszeichen nicht verschwunden sind. Den besten Gesundheitszustand weisen die Gruppen auf, die 20 μg Vitamin D_3 , 2,2 μg $1,25(OH)_2D_3$ oder 18 μg $1,25(OH)_2D_2$ erhielten.

Wie in Tabelle 13 ersichtlich ist, zeichnet sich das gleiche Ergebnis bei der Gewichtsentwicklung ab. Hier ist aber eine genauere Differenzierung zwischen den einzelnen Gruppen möglich. Die größte Gewichtszunahme wird durch 18 μg $1,25(OH)_2D_2$ erzielt, gefolgt von 2,2 μg $1,25(OH)_2D_3$ und 20 μg Vitamin D_3 . Ebenfalls deutlich gegenüber der Kontrollgruppe ist die Steigerung der Gewichtszunahme bei den übrigen Gruppen. Die Tiere der Vitamin D_2 -Gruppe fielen schon während des Versuches durch schlechte Futteraufnahme auf, so daß die Gewichtszunahme dieser Gruppe unberücksichtigt bleibt. Innerhalb der $1,25(OH)_2D_3$ - und der $1,25(OH)_2D_2$ -Grup-

pen scheint eine dosisabhängige Steigerung der Gewichtszunahme vorzuliegen. Die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ -Werte liegen dabei höher als die entsprechenden $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Werte.

Die CaBP-Werte, in Tabelle 14 aufgeführt, machen dieses Ergebnis noch deutlicher. Während Vitamin D_2 nur eine geringe Steigerung der CaBP-Aktivität um ca. 30 % bewirkt, wird durch die äquimolare Menge Vitamin D_3 der ungefähr 5-fache Kontrollwert erreicht. Nur um ca. 8 % niedriger liegt der Wert für Goldhafer. Ähnlich wie in Versuch III a liegen auch hier die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ -Werte über den entsprechenden $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Werten, bis auf die mittleren Konzentrationen, welche die gleiche Aktivität aufweisen. Die CaBP-Aktivität steigt dabei dosisabhängig an. Für $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ scheint eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung vorzuliegen, die Korrelation der errechneten Regressionsgeraden beträgt 0,99.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß der Goldhafer die ungefähr gleiche Vitamin D-artige Aktivität wie 20 μg Vitamin D_3 besitzt.

Die 8-fachen äquimolaren Mengen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ besitzen eine größere, mindestens jedoch die gleiche biologische Aktivität wie die entsprechenden $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Konzentrationen.

Vitamin D_2 zeigt eine deutlich geringere antirachitische Wirksamkeit als Vitamin D_3 .

Der Vergleich der Parameter Gesundheitszustand und Gewichtsentwicklung in Versuch III a und III b zeigt, daß im Modell der strontiuminduzierten Rachitis die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -artig wirkenden Metaboliten und Strontium gegensinnig auf diese Parameter einwirken.

Tabelle 13
Versuch III b

Basaldiät II: 1,0 % Ca
(n = 10)

Gewichtsentwicklung⁺

Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
D-freie Kontrolle	9,2	3,2
20 µg Vitamin D ₃	15,5	1,9
20,7 µg Vitamin D ₂	7,5	3,9
4,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	14,3	4,4
9,0 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	14,8	1,7
18,0 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	17,3	1,5
0,55 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	13,8	4,0
1,1 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	13,7	3,5
2,2 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	15,9	2,2
200 g Goldhafer (16.9.1982)	13,3	2,5

⁺ Angabe in g Gewichtszunahme pro Tier und Tag

Tabelle 14
Versuch III b

Basaldiät II: 1,0 % Ca
(n = 10)

CaBP in der Dünndarmmukosa⁺

Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
D-freie Kontrolle	1,14	0,42
20 µg Vitamin D ₃	6,01	0,75
20,7 µg Vitamin D ₂	1,49	0,36
4,5 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	3,09	1,14
9,0 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	4,01	1,13
18,0 µg 1,25(OH) ₂ D ₂	6,09	1,89
0,55 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	2,24	0,90
1,1 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	3,95	1,70
2,2 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	4,58	1,91
200 g Goldhafer (16.9.1982)	5,64	2,25

⁺ % Radioaktivität im Überstand, bezogen auf die Gesamtra-
dioaktivität, pro mg Gesamtprotein der Probe

4.5 VERSUCH IV

Da im Versuch III b gezeigt werden konnte, daß Vitamin D₂ gegenüber Vitamin D₃ eine wesentlich geringere biologische Aktivität besitzt, sollte in diesem Versuch die relative antirachitische Aktivität von Vitamin D₂ im Vergleich zu Vitamin D₃ ermittelt werden. Dazu wurden in zwei Versuchsgruppen die 6- und 12-fache äquimolare Menge Vitamin D₂ eingesetzt. Zusätzlich sollte in beiden Versuchsmodellen die Wirksamkeit von Goldhafer der Ernte 13.5.1983 bestimmt werden.

Ergebnisse

Wie im Versuch III ist eine Differenzierung bezüglich des Gesundheitszustandes nur bei den Tieren möglich, die strontiumfrei ernährt wurden. Die Gruppen, die Goldhafer, Vitamin D₃ oder 124 µg Vitamin D₂ erhielten, weisen am Versuchsende den besten Gesundheitszustand auf. Die Kontrollgruppe zeigt die typischen rachitischen Symptome.

Die Gewichtsentwicklung bei den strontiumfrei ernährten Versuchsgruppen (Tabelle 15) zeigt für Goldhafer den größten Anstieg der Gewichtszunahme. Auch Vitamin D₃ bewirkt eine deutliche Steigerung der Zunahme gegenüber der Kontrollgruppe, während durch Vitamin D₂ keine Steigerung zu erreichen ist. Die geringste Gewichtszunahme bewirkt der Ätherextrakt-rückstand.

Am Modell der strontiuminduzierten Rachitis zeigt sich wieder die gegensinnige Wirkung von Strontium und Vitamin D₃-Metaboliten auf diesen Parameter (Tabelle 17).

Tabelle 16 zeigt, daß Goldhafer und 10 µg Vitamin D₃ im Modell der Vitamin D-depletierten Rachitis die gleiche CaBP-

Aktivität erzeugen. Die Werte für Ätherextrakt und Ätherextraktrückstand belegen, daß der Hauptanteil der Vitamin D-artigen Aktivität im Ätherextrakt vorhanden ist. Die 6- und die 12-fache äquimolare Menge Vitamin D_2 sind nicht in der Lage, den CaBP-Wert von Vitamin D_3 zu erzeugen, gegenüber der Kontrollgruppe zeigen die D_2 -Gruppen aber einen deutlichen Anstieg.

Im Modell der strontiuminduzierten Rachitis erreicht Goldhafer den gleichen CaBP-Wert wie $1,1\mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2D_3$ (Tabelle 18).

Der Serumstrontiumspiegel der Goldhafergruppe und der Ätherextraktrückstandgruppe liegt zwischen 1,1 und $2,2\mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2D_3$ (Tabelle 19).

Die CaBP-Aktivität von Goldhafer entspricht der von $10\mu\text{g}$ Vitamin D_3 im Modell der Vitamin D-depletierten Rachitis und der von ca. $1,1\mu\text{g } 1,25(\text{OH})_2D_3$ im Modell der strontiuminduzierten Rachitis.

Vitamin D_2 konnte bei beiden Parametern, der Gewichtsentwicklung und der CaBP-Aktivität, selbst bei 12-facher Konzentration die biologische Wirksamkeit von Vitamin D_3 nicht erreichen.

Die Vitamin D-artige Aktivität von Goldhafer löste sich zum großen Teil in Äther.

Tabelle 15
Versuch IV

Basaldiät II: 1,0 % Ca
(n = 10)

Gewichtsentwicklung⁺

Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
D-freie Kontrolle	12,2	3,0
200 g Goldhafer (31.5.1983)	15,4	2,2
Ätherextrakt von 200 g Goldhafer	13,4	2,1
Ätherextraktrückstand von 200 g Goldhafer	9,2	3,5
10 µg Vitamin D ₃	14,0	2,7
62 µg Vitamin D ₂	11,6	2,6
124 µg Vitamin D ₂	11,9	2,4

⁺ Angabe in g Gewichtszunahme pro Tier und Tag

Tabelle 16
Versuch IV

Basaldiät II: 1,0 % Ca
(n = 10)

CaBP in der Dünndarmmukosa⁺

Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
D-freie Kontrolle	0,87	0,26
200 g Goldhafer (31.5.1983)	5,13	1,20
Ätherextrakt von 200 g Goldhafer	4,25	2,02
Ätherextraktrückstand von 200 g Goldhafer	1,53	0,50
10 µg Vitamin D ₃	5,23	0,82
62 µg Vitamin D ₂	1,23	0,19
124 µg Vitamin D ₂	2,32	0,85

Tabelle 17
Versuch IV

Basaldiät I: 1,32 % Sr
(n = 10)

Gewichtsentwicklung⁺

Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
200 g Goldhafer (31.5.1983)	8,3	3,7
Ätherextrakt von 200 g Goldhafer	11,5	1,8
Ätherextraktrückstand von 200 g Goldhafer	8,8	3,6
1,1 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	9,5	2,2
1,65 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	8,6	3,2

⁺ Angabe in g Gewichtszunahme pro Tier und Tag

Tabelle 18
Versuch IV

Basaldiät I: 1,32 % Sr
(n = 10)

CaBP in der Dünndarmmukosa⁺

Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
200 g Goldhafer (31.5.1983)	1,30	0,36
Ätherextrakt von 200 g Goldhafer	1,18	0,26
Ätherextraktrückstand von 200 g Goldhafer	1,06	0,25
1,1 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	1,29	0,27
1,65 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	2,04	0,65

⁺ % Radioaktivität im Überstand, bezogen auf die Gesamtra-
dioaktivität, pro mg Protein der Probe

Tabelle 19
Versuch IV

Basaldiät I: 1,32 ‰ Sr
(n = 10)

Serumstrontium
(in mmol pro l)

Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
200 g Goldhafer (31.5.1983)	0,56	0,10
Ätherextrakt von 200 g Goldhafer	0,52	0,10
Ätherextraktrückstand von 200 g Goldhafer	0,57	0,10
1,1 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,53	0,09
1,65 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	0,61	0,09

4.6 VERSUCH V

Nachdem im Versuch IV bewiesen werden konnte, daß die 12-fache äquimolare Menge Vitamin D_2 nicht ausreicht, um die biologische Aktivität von Vitamin D_3 zu erzeugen, wurde Vitamin D_2 in einem noch größeren Konzentrationsverhältnis verabreicht. Dazu wurde im Modell der Vitamin D-depletierten Rachitis jeweils 3 Vitamin D_3 - und Vitamin D_2 -Konzentrationen in einem äquimolaren Konzentrationsbereich von 1 : 5 bis 1 : 80 eingesetzt. Durch Einsatz von $24,25(OH)_2D_3$ zusammen mit und im Vergleich zu $1,25(OH)_2D_3$ sollte geklärt werden, wie groß die biologische Wirksamkeit von $24,25(OH)_2D_3$ ist und ob die gemeinsame Verabreichung von $1,25(OH)_2D_3$ und $24,25(OH)_2D_3$ einen synergistischen Effekt auf die Parameter Gewichtsentwicklung und CaBP-Aktivität zur Folge hat.

Ergebnisse

Den besten Gesundheitszustand weisen am Versuchsende die Gruppen auf, die $1,1 \mu g$ $1,25(OH)_2D_3$ oder $1,1 \mu g$ $1,25(OH)_2D_3$ kombiniert mit $24,25(OH)_2D_3$ erhielten. Die Tiere der Kontrollgruppe zeigen deutliche rachitische Symptome, bei den Tieren der $5,5 \mu g$ $24,25(OH)_2D_3$ -Gruppe waren die Symptome in abgeschwächter Form vorhanden. Zwischen den übrigen Gruppen konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Tabelle 20 und 22 geben die Gewichtsentwicklung wieder. Die höchsten Gewichtszunahmen werden durch die Gruppen erreicht, die $1,25(OH)_2D_3$ kombiniert mit $24,25(OH)_2D_3$ erhielten. Auch $1,25(OH)_2D_3$ erzeugt einen deutlichen Anstieg der Gewichtszunahme, während $24,25(OH)_2D_3$ erst bei $22 \mu g$ pro kg Futter einen positiven Effekt auf diesen Parameter ausübt.

Die Steigerung der Gewichtszunahme durch 2,5 µg Vitamin D₃ liegt über den Werten von 51,7 und 103,4 µg Vitamin D₂. Vitamin D₂ erreicht erst bei der höchsten Dosierung einen größeren Anstieg des Wertes als die Vitamin D₃-Gruppen.

Wie in Tabellen 21 und 23 aufgeführt ist, zeigen die Vitamin D₃-Gruppen eine dosisabhängige Steigerung der CaBP-Aktivität, ebenso die Vitamin D₂-Gruppen. Der CaBP-Wert der niedrigsten Vitamin D₃-Dosis übersteigt dabei den Wert der höchsten Vitamin D₂-Dosis. 22 µg 24,25(OH)₂D₃ bewirken eine um 10 % geringere CaBP-Aktivität als 1,1 µg 1,25(OH)₂D₃. Die Addition des Anstieges der CaBP-Werte der 1,25(OH)₂D₃- und 24,25(OH)₂D₃-Gruppen liegt deutlich unter der Steigerung, die durch die entsprechenden Metabolitkombinationen erzielt wird.

In Versuch V konnte gezeigt werden, daß die antirachitische Wirksamkeit von Vitamin D₂ in diesem Versuchsmodell mehr als 80 mal geringer ist als die von Vitamin D₃.

Die Aktivität von 22 µg 24,25(OH)₂D₃ ist ungefähr gleich groß wie die von 1,1 µg 1,25(OH)₂D₃. Die Metabolitkombinationen von 1,25(OH)₂D₃ und 24,25(OH)₂D₃ erzeugen sowohl bei der Gewichtszunahme als auch bei der CaBP-Aktivität im Vergleich zu den einzeln verabreichten Metaboliten deutlich höhere Werte.

Bezüglich der Gewichtsentwicklung scheinen die Metabolitkombinationen dabei additive, bezüglich der CaBP-Aktivität synergistische Wirkung zu besitzen.

Tabelle 20

Basaldiät II: 1 % Ca

Versuch V

(n = 10)

Gewichtsentwicklung⁺

Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
D-freie Kontrolle	11,8	3,8
0,55 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	13,1	3,0
1,1 µg 1,25(OH) ₂ D ₃	15,2	3,1
5,5 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	11,6	3,1
22,0 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	14,3	2,1
0,55 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ und 5,5 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	13,7	3,0
0,55 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ und 22,0 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	14,6	2,8
1,1 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ und 5,5 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	15,9	3,1
1,1 µg 1,25(OH) ₂ D ₃ und 22,0 µg 24,25(OH) ₂ D ₃	17,4	1,4

⁺ Angabe in g Gewichtszunahme pro Tier und Tag

Tabelle 21

Versuch V

Basaldiät II: 1 % Ca

(n = 10)

CaBP in der Dünndarmmukosa⁺

Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
D-freie Kontrolle	1,85	0,34
0,55 μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	2,42	0,53
1,1 μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	3,86	0,69
5,5 μg $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	2,01	0,38
22,0 μg $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	3,55	0,92
0,55 μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und 5,5 μg $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	3,34	0,78
0,55 μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und 22,0 μg $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	5,40	3,06
1,1 μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und 5,5 μg $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	6,38	1,64
1,1 μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und 22,0 μg $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	7,35	1,63

⁺ % Radioaktivität im Überstand, bezogen auf die Gesamtra-
dioaktivität, pro mg Gesamtprotein der Probe

Tabelle 22

Basaldiät II: 1 ‰ Ca

Versuch V

(n = 10)

Gewichtsentwicklung⁺

Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
D-freie Kontrolle	11,8	3,8
2,5 µg Vitamin D ₃	14,2	2,4
5,0 µg Vitamin D ₃	14,2	1,2
10,0 µg Vitamin D ₃	14,8	1,6
51,7 µg Vitamin D ₂	12,8	3,2
103,4 µg Vitamin D ₂	13,0	4,5
206,8 µg Vitamin D ₂	15,5	2,7

⁺ Angabe in g Gewichtszunahme pro Tier und Tag

Tabelle 23
Versuch V

Basaldiät II: 1 % Ca
(n = 10.)

CaBP in der Dünndarmmukosa⁺

Diätzusatz pro kg Futter	$\bar{x}$	$\pm s$
D-freie Kontrolle	1,85	0,34
2,5 µg Vitamin D ₃	3,63	1,19
5,0 µg Vitamin D ₃	6,12	1,62
10,0 µg Vitamin D ₃	9,75	2,10
51,7 µg Vitamin D ₂	1,97	0,53
103,4 µg Vitamin D ₂	2,21	0,59
206,8 µg Vitamin D ₂	2,79	1,64

⁺ % Radioaktivität im Überstand, bezogen auf die Gesamtra-
dioaktivität, pro mg Gesamtprotein der Probe

5. Diskussion

5.1 1,25(OH)₂D₃-ARTIGE AKTIVITÄT VON S. MALACOXYLON UND T. FLAVESCENS

Daß S. malacoxylon eine 1,25(OH)₂D₃-artige Aktivität besitzt, wurde schon von WASSERMAN (1974) am Modell der strontiuminduzierten Rachitis nachgewiesen. Trotz der strontiumbedingten Hemmung der 1 α -Hydroxylase bewirkte die Verabreichung von S. malacoxylon beim Hühnerküken die Synthese von CaBP. Da das CaBP in diesem Modell nur durch die Wirkung von Metaboliten mit 1,25(OH)₂D₃-artiger Aktivität gebildet werden kann und da die CaBP-Menge mit der 1,25(OH)₂D₃-Konzentration korreliert ist (FRIEDLANDER et al., 1977; ARMBRECHT et al., 1980), schien das strontiuminduzierte Rachitismodell und die Bestimmung der CaBP-Aktivität zum Nachweis und zur Quantifizierung einer 1,25(OH)₂D₃-artigen Aktivität geeignet zu sein.

In den eigenen Untersuchungen wurde einerseits die Eignung dieses Modells mit S. malacoxylon und 1,25(OH)₂D₃ überprüft, andererseits sollte die metabolitartige Aktivität von S. malacoxylon, T. flavescens und 1,25(OH)₂D₃ verglichen werden.

Mit Hilfe des Parameters CaBP-Aktivität war es möglich, die Aktivität von S. malacoxylon im Vergleich zu der von 1,25(OH)₂D₃ zu quantifizieren. 2 g S. malacoxylon-Trockensubstanz induzierten dabei die CaBP-Neusynthese in gleichem Maß wie 2,2 μ g 1,25(OH)₂D₃. Damit besitzt S. malacoxylon pro kg Trockensubstanz ungefähr die gleiche Aktivität wie 1 mg 1,25(OH)₂D₃. Dies entspricht der von SCHWAB (1983) am gleichen Versuchsmodell und der von WALLING und KIMBERG (1975) an Vitamin D-mangelernährten Ratten ermittelten Wirkungsäquivalenz. Die Beziehung zwischen der Konzentration an S. mala-

coxylon und der CaBP-Aktivität scheint in der eigenen Untersuchung in dem eingesetzten Konzentrationsbereich linear zu sein, wie aus Abbildung 1 hervorgeht.

CaBP

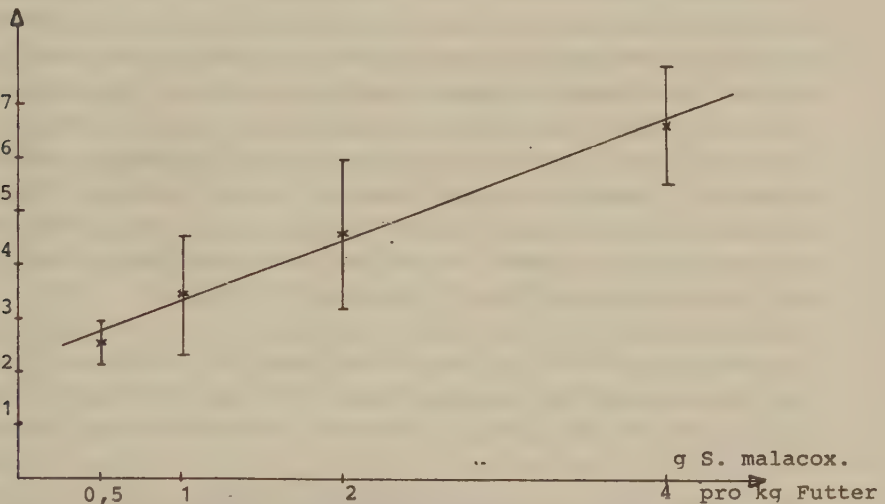


Abb. 1: Abhängigkeit der CaBP-Aktivität von der S. malcoxylon-Konzentration

Die Zunahme des Körpergewichtes wies, wie aus den Versuchsergebnissen ersichtlich ist, keine entsprechende Steigerung auf. Die Beurteilung dieses Parameters, der beim rachitischen Küken ebenfalls eine klare Vitamin D-Abhängigkeit zeigt, ist in diesem Modell etwas problematisch, da sich möglicherweise zwei Effekte überlagern. Einerseits besitzt ein $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -wirksamer Metabolit eine rachitisheilende und damit gewichtssteigernde Wirkung. Andererseits aber wirkt dieser Metabolit bei Überdosierung toxisch und damit gewichtsdeprimierend. Zusätzlich wird durch die Metabolitwirkung vermehrt Strontium resorbiert, das seinerseits eben-

falls über seine toxischen Wirkungen die Gewichtsentwicklung negativ beeinflussen kann.

Die verschiedenen Goldhaferchargen überwandten die strontium-induzierte Hemmung der 1α -Hydroxylase, wie am Parameter CaBP-Aktivität ersichtlich ist. In Bezug auf die Gewichtsentwicklung gilt für die Goldhafergruppen das gleiche wie für die *S. malacoxylon*-Gruppen. Zusätzlich könnte aber bei den Gruppen, die Goldhafer oder den Extraktückstand von Goldhafer erhielten, das größere Volumen und die veränderte Konsistenz des Futters einen Einfluß auf diesen Parameter haben, so daß die Beurteilung der Vitamin D-metabolitartigen Aktivität von Goldhafer vor allem mit den über die CaBP-Aktivitätsbestimmung erhaltenen Werten erfolgt.

Der direkte Vergleich der metabolitartigen Aktivität von Goldhafer und *S. malacoxylon* ergab eine ca. 300-fache Wirksamkeit von *S. malacoxylon*. RAMBECK und ZUCKER (1982) sowie SCHWAB (1983) ermittelten eine 50- bis 100-fache Aktivität von *S. malacoxylon* gegenüber Goldhafer. Eine Erklärung für diese Unterschiede könnte die von SCHWAB (1983) festgestellte unterschiedlich große metabolitartige Wirksamkeit verschiedener Goldhaferchargen darstellen.

Beim direkten Vergleich der durch Goldhafer bzw. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induzierten Neusynthese von CaBP in den Folgeversuchen zeigte sich, daß im Goldhafer ein Wirkstoffgehalt von 5 - 10 μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Äquivalenten pro kg Trockensubstanz vorhanden ist. Dieser Wert deckt sich mit den Ergebnissen von RAMBECK und ZUCKER (1982) am gleichen Versuchsmodell. Daß die metabolitartige Aktivität von Goldhafer nicht in allen Versuchen gleich groß war, ist ein weiterer Hinweis dafür, daß verschiedene Goldhaferchargen bezüglich der Vitamin D_3 -metabolitartigen Aktivität Schwankungen aufweisen.

Der Versuch der Extraktion der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -artig wirksamen Fraktion des Goldhafers mit Hilfe verschiedener Lösungsmittel zeigte, daß in keinem dieser Lösungsmittel eine deutliche Anreicherung der metabolitartigen Aktivität nachzuweisen war.

Sowohl im Ätherextrakt als auch im Ätherextraktrückstand war in allen Versuchen metabolitartige Aktivität vorhanden, was darauf hindeuten könnte, daß möglicherweise mehrere metabolitartig wirksame Substanzen im Goldhafer vorliegen. Die Auftrennung des Äther- und des Äthanolextraktrückstandes von Goldhafer mit einem Methanol-Chloroformgemisch führte zu keinen eindeutigen Ergebnissen. Auch die vergleichsweise große metabolitartige Aktivität im Äthanolextrakt kann nur zu der Vermutung führen, daß sich möglicherweise die $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -artig wirksamen Substanzen in diesem Lösungsmittel besonders gut lösen, da insgesamt die Vitamin D_3 -metabolitartige Aktivität des eingesetzten Goldhafers als zu gering für diese Extraktionsversuche anzusehen ist.

Die Vitamin D-artige Aktivität von Goldhafer wurde ohne Strontiumzusatz im üblichen Vitamin D-depletierten Rachitismodell untersucht. Für 1 kg Goldhafertrockensubstanz vom 16.9.1982 konnte eine Vitamin D-artige Wirksamkeit entsprechend der von 80 - 100 μg Vitamin D_3 ermittelt werden. Dies entspricht sowohl den analytischen Befunden von RAMBECK et al. (1979), als auch den in Bioassays an der Ratte, japanischen Wachtel (RAMBECK et al., 1981a) und am Hühnerküken (BITTNER, 1979) festgestellten Werten. Der Goldhafer vom 31.5.1983 zeigte dagegen nur ca. die Hälfte der Vitamin D-artigen Aktivität. Da ZUCKER et al. (1980) die Abhängigkeit der Vitamin D-artigen Aktivität des Goldhafers von Jahreszeit und Vegetationszustand ausschließen konnten, könnte ein zu geringer Blattanteil die Ursache hierfür sein (STARK, 1979). Der größte Teil der antirachitischen Aktivität befand sich im Vitamin D_3 -enthaltenden Ätherextrakt des Goldhafers.

5.2 DIE ANTIRACHITISCHE AKTIVITÄT VON 1,25-DIHYDROXYERGO-CALCIFEROL ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$)

Durch die Bestimmung der CaBP-Aktivität in der Dünndarmmukosa konnte in zwei verschiedenen Bioassays nachgewiesen werden, daß die biologische Wirksamkeit von synthetisch hergestelltem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ bei Hühnerküken wesentlich geringer ist als die von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Bei Verabreichung beider Metaboliten über das Futter besaß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ sowohl im Modell der strontiuminduzierten Rachitis als auch im Vitamin D-depletierten Rachitismodell nur 1/6 - 1/8 der Wirksamkeit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Abb. 2). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von JONES et al. (1976a), welche die Wirksamkeit von aus Nierenmitochondrien gewonnenem $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ nach intravenöser Verabreichung am Hühnerküken untersuchten und die gleiche relative Aktivität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ermittelten. Da das Huhn sowohl bei oraler, als auch bei intravenöser Verabreichung die gleiche Diskriminierung gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ zeigt, kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß eine unterschiedliche Resorptionsrate beider Metaboliten als Ursache für die geringere Wirksamkeit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ beim Huhn auszuschließen ist. Die Ursache dieser Diskriminierung beim Huhn scheint also entweder mit einer schnelleren Metabolisierung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ zu einem unwirksamen Metaboliten oder mit einer schnelleren Ausscheidung, eventuell bedingt durch schlechtere Bindung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ an das spezifische Vitamin D-bindende Transportprotein zusammenzuhängen, zumal die Rezeptorbindung in der Darmmukosazelle für die 1,25-Dihydroxymetaboliten von Vitamin D_2 und D_3 ungefähr gleich groß ist (KREAM et al., 1977).

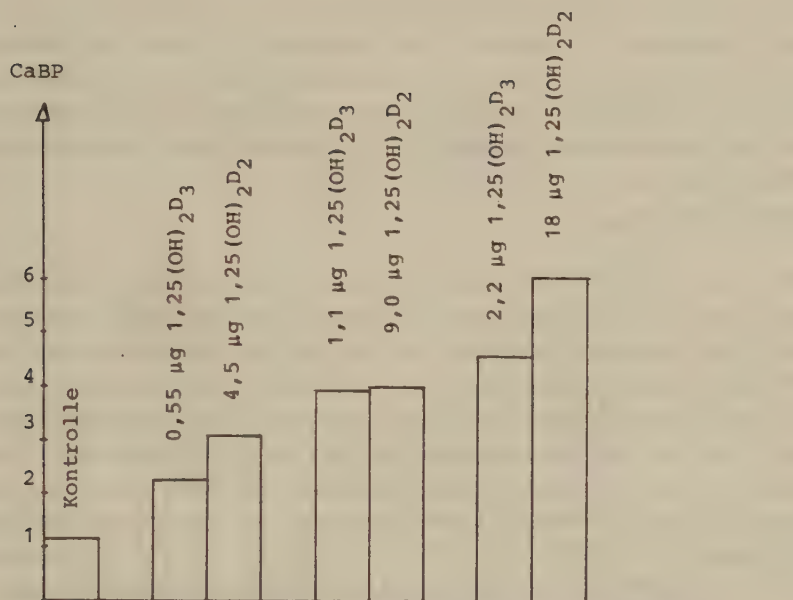


Abb. 2: Vergleich von 1,25(OH)₂D₃ mit der 8-fachen äquimolaren Menge 1,25(OH)₂D₂

Desweiteren konnte in der eigenen Untersuchung eine positive Korrelation zwischen 1,25(OH)₂D₂ und CaBP-Aktivität sowie zwischen 1,25(OH)₂D₃ und CaBP-Aktivität nachgewiesen werden. Im eingesetzten Konzentrationsbereich scheint dabei die Dosis-Wirkungsbeziehung für beide 1,25-Dihydroxymetaboliten linear zu sein.

Die Gewichtsentwicklung war im Modell der Vitamin D-depletierten Rachitis ebenfalls positiv korreliert zu den 1,25(OH)₂D₃- und 1,25(OH)₂D₂-Konzentrationen. Damit konnte gezeigt werden, daß beide Metaboliten in einem noch nicht toxischen Konzentrationsbereich eingesetzt wurden. Die lediglich bei der strontiuminduzierten Rachitis festgestellte Ge-

wichtsdepression bei den höheren Metabolitkonzentrationen ist wiederum als Zunahme der toxischen Wirkung von Strontium, bedingt durch gesteigerte Resorption, zu werten. Die Serumstrontiumwerte geben nur die Tendenz einer vermehrten Strontiumresorption wieder, da Strontium wie Calcium nach der Resorption möglicherweise sofort in die Knochen eingebaut wird.

Beim Vergleich der antirachitischen Aktivität von Vitamin D_3 und Vitamin D_2 zeigte sich, daß die Unterschiede bezüglich der CaBP-Aktivität zwischen den beiden unmetabolisierten Vitaminen noch größer war als zwischen den entsprechenden 1,25-Dihydroxymetaboliten. 206 μg Vitamin D_2 reichten nicht aus, um die CaBP-Neusynthese in dem Maß zu induzieren, wie dies 2,5 μg Vitamin D_3 vermochten. Das bedeutet, daß in diesem Versuchsmodell Vitamin D_2 eine um mindestens 80 mal geringere Wirksamkeit besitzt als Vitamin D_3 . Die Diskriminierung gegenüber Vitamin D_2 ist folglich beim Hühnerküken noch wesentlich größer als gegenüber dem 1,25-Dihydroxymetaboliten von Vitamin D_2 (Abb. 3).

Demnach müssen mindestens zwei Diskriminierungsstufen existieren, eine vor der Hydroxylierung zu $1,25(\text{OH})_2D_2$ und eine danach.

Da aus der eigenen Untersuchung hervorgeht, daß $1,25(\text{OH})_2D_2$ die strontiuminduzierte Hemmung der Nierenhydroxylase ebenso überwinden kann wie $1,25(\text{OH})_2D_3$, könnte es sich bei der im Goldhafer enthaltenen metabolitartigen Komponente auch um $1,25(\text{OH})_2D_2$ handeln.

$1,25(\text{OH})_2D_2$ zeigt aber bei der Ratte die gleiche (JONES et al., 1975; RAMBECK et al., in Druck), beim Huhn eine um 6 - 8 mal geringere Wirksamkeit als $1,25(\text{OH})_2D_3$, während Goldhafer bei beiden Tierarten ungefähr die gleiche metabolitartige Aktivität besitzt. Somit kann ausgeschlossen werden, daß $1,25(\text{OH})_2D_2$ die metabolitartig wirksame Substanz des Goldhafers ist, denn sonst müßte die $1,25(\text{OH})_2D_3$ -artige Wirkung

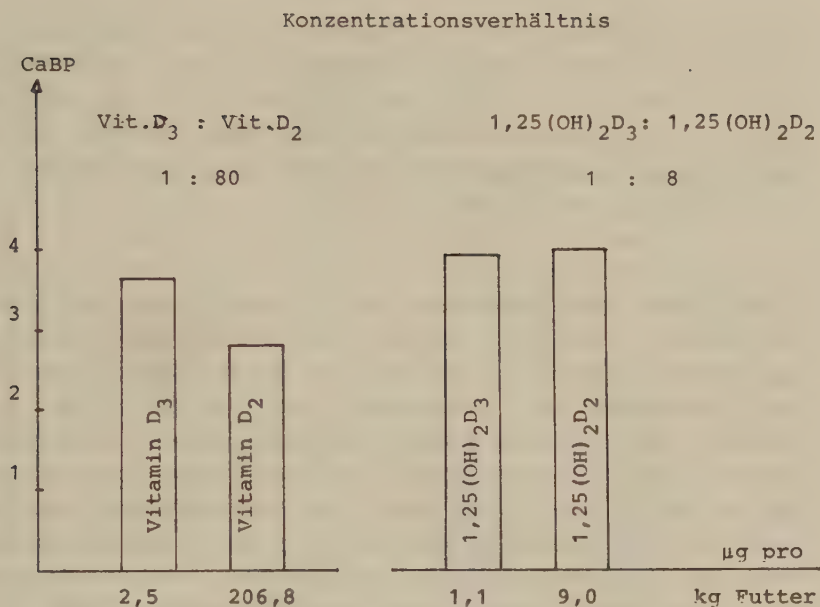


Abb. 3: Vergleich zwischen Vitamin D₃ und Vitamin D₂
sowie zwischen 1,25(OH)₂D₃ und 1,25(OH)₂D₂

von Goldhafer bei der Ratte größer sein als beim Huhn. Falls sich die metabolitartige Aktivität des Goldhafers aus mehreren Komponenten zusammensetzt, kann 1,25(OH)₂D₂ zumindest keine quantitativ wesentliche Komponente sein.

5.3 STIMULIERENDER EFFEKT VON 24,25(OH)₂D₃ AUF DIE WIRKUNG VON 1,25(OH)₂D₃

Im üblichen Vitamin D-depletierten Rachitismodell konnte gezeigt werden, daß neben 1,25(OH)₂D₃ auch der 24,25-Dihydroxy-metabolit von Vitamin D₃ eine, wenn auch wesentlich geringe-

re antirachitische Aktivität besitzt. In der 20-fachen Konzentration von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eingesetzt, zeigte $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sowohl bezüglich des Parameters CaBP-Aktivität als auch bezüglich der Gewichtsentwicklung deutliche Wirkung. 22 μg $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erzeugten dabei ungefähr die gleiche CaBP-Aktivität wie 0,55 μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Die kombinierte Verabreichung beider Metaboliten, das heißt Zusatz einer hohen Konzentration $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu einer geringen Menge $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, scheint einen additiven Effekt auf die Gewichtsentwicklung zu besitzen. Dieser Effekt wird noch deutlicher bei der Betrachtung der CaBP-Aktivität. Hier scheint nicht nur eine additive Wirkung, sondern eine Potenzierung der Aktivität durch die gemeinsame Verabreichung beider Metaboliten vorzuliegen. Die Kombinationen erzeugten gegenüber der Kontrolle eine um 50 - 100 % größere Steigerung der CaBP-Aktivität, als die Summe der Steigerungen durch die einzeln verabreichten Metaboliten ergibt (Abb. 4).

Dies könnte ein weiterer Beweis für die Annahme sein, daß beide Metaboliten notwendig sind, um das ganze Spektrum der Wirkungen von Vitamin D_3 zu erzeugen.

Die Vitamin D-artige Komponente des Goldhafers konnte als Vitamin D_3 identifiziert werden. Demgegenüber ist die metabolitartig wirksame Komponente noch nicht identifiziert. Der Nachweis einer synergistischen Wirkung zwischen $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ läßt es möglich erscheinen, daß sich die metabolitartige Aktivität des Goldhafers aus einer Kombination dieser beiden Metaboliten zusammensetzt.

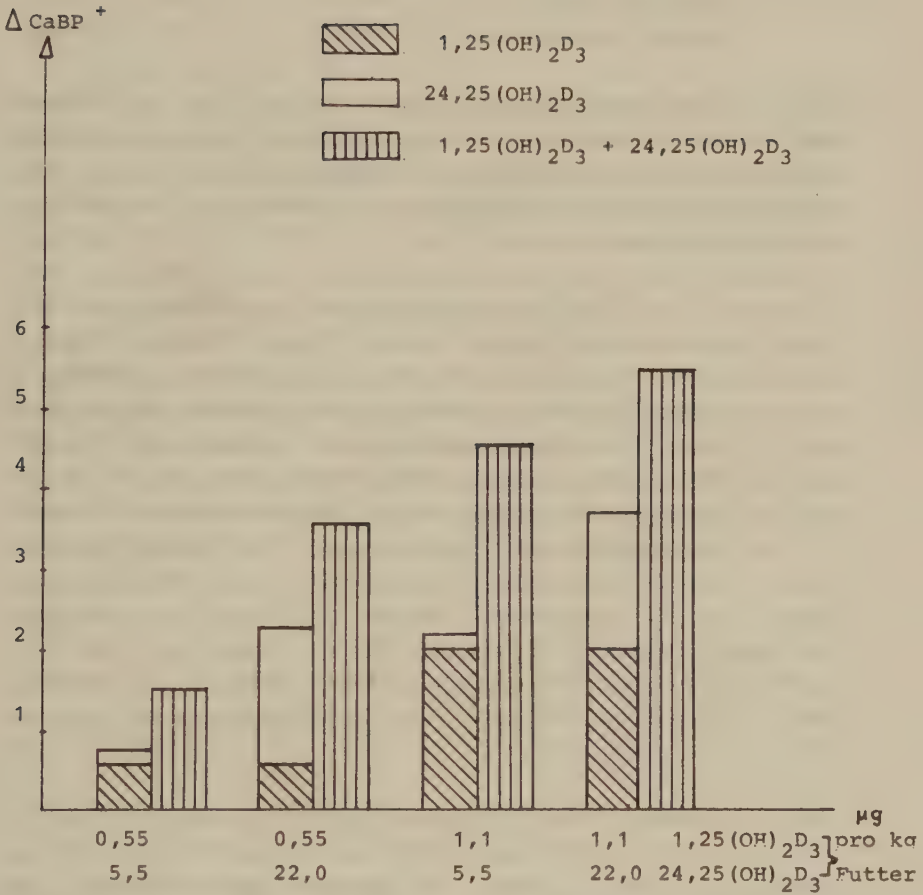


Abb. 4: Vergleich von 1,25(OH)₂D₃ und 24,25(OH)₂D₂ mit den entsprechenden Kombinationen beider Metaboliten

+ ΔCaBP = Steigerung der CaBP-Aktivität gegenüber der Kontrolle

6. Zusammenfassung

In fünf Fütterungsversuchen wurde die Wirkung von *Solanum malacoxylon*, *Trisetum flavescens* und dessen Aufbereitungsformen sowie von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ auf verschiedene Vitamin D-abhängige Parameter bei rachitischen Hühnerküken untersucht.

S. malacoxylon besaß bezüglich seiner metabolitartigen Aktivität einen Wirkstoffgehalt von ca. 1 mg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Äquivalenten pro kg Trockensubstanz. Zwischen der Konzentration an *S. malacoxylon* und dem Parameter CaBP-Aktivität konnte dabei eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung nachgewiesen werden. Für *T. flavescens* lag der Wirkstoffgehalt zwischen 5 und 10 μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Äquivalenten pro kg Trockensubstanz mit deutlichen chargenabhängigen Schwankungen. Der Versuch der Extraktion und Anreicherung der metabolitartig wirksamen Komponente von *T. flavescens* führte auf Grund der geringen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -artigen Aktivität von *T. flavescens* nicht zu eindeutigen Ergebnissen. Die Vitamin D-artige Wirksamkeit von *T. flavescens* entsprach pro kg Trockensubstanz der von 80 - 100 μg Vitamin D_3 .

Das vor kurzem erstmals chemisch synthetisierte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ wurde sowohl am Modell der strontiuminduzierten Rachitis als auch am üblichen Vitamin D-depletierten Rachitismodell bei Hühnerküken untersucht. In beiden Testsystemen besaß $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ nur 1/6 bis 1/8 der Wirksamkeit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ bezüglich der Induktion der Neusynthese von CaBP in der Dünndarmmukosa. Während die antirachitische Aktivität von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ beim Vogel also fast um eine 10er Potenz unter der von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ liegt, ist die Wirksamkeit beider Metaboliten bei der Ratte annähernd gleich groß. Da *T. flavescens* aber bei beiden Tierarten gleiche metabolitartige Aktivität

besitzt, kann das $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ als metabolitartig wirksamer Inhaltsstoff von *T. flavescens* ausgeschlossen werden.

Vitamin D_2 zeigte im gleichen Testsystem an Vitamin D-depletierten Hühnerküken weniger als 1/80 der Wirksamkeit von Vitamin D_3 . Damit ist die Diskriminierung gegenüber Vitamin D_2 wesentlich größer als gegenüber $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$. Die Diskriminierung gegenüber Vitamin D_2 beim Huhn setzt sich also mindestens aus zwei Diskriminierungsschritten zusammen, einem vor und einem nach der Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$.

$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zeigte, in 20-fach höherer Konzentration als $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eingesetzt, deutliche antirachitische Aktivität. Bei kombinierter Verabreichung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ wurde sogar eine synergistische Wirkung der beiden Metaboliten auf die Synthese des duodenalen CaBP festgestellt.

Summary

Comparative studies on the influence of Solanum malacoxylon, Trisetum flavescens, 1,25-dihydroxycholecalciferol, 1,25-dihydroxyergocalciferol and 24,25-dihydroxycholecalciferol in rachitic chicks.

In five feeding experiments the effects of Solanum malacoxylon, Trisetum flavescens, its extracts and extract residues as well as of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on vitamin D-dependent parameters were studied in rachitic chicks.

1 kg dried Solanum malacoxylon had a vitamin D-metabolite-like activity of about 1 mg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -equivalents. Between Solanum malacoxylon concentration and CaBP-activity there was a close dose-response-relation. 1 kg dried Trisetum flavescens was equivalent to 5 to 10 μg $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Due to the low vitamin D_3 -metabolite-like activity in Trisetum flavescens it was impossible to purify the metabolite-like component to a further degree. 1 kg dried Trisetum flavescens showed the same vitamin D-like activity as 80 to 100 μg vitamin D_3 .

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$, which was synthesized recently, has been investigated in chicks, which were rachitic either due to vitamin D-deficiency or due to strontium in the diet. In both assays $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ was only 1/6 - 1/8 as active as $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in inducing the formation of CaBP in the duodenal mucosa. While the antirachitic activity of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ in the chicken is nearly ten times lower than that of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, in the rat this two metabolites have nearly the same activity. Since Trisetum flavescens in both animals has

the same metabolite-like activity, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ can not be the metabolite-like component of *Trisetum flavescens*.

Vitamin D_2 was in the same assay of vitamin D-depleted chicks less than $1/80$ as active as vitamin D_3 . Therefore in chicken the discrimination against vitamin D_2 is much larger than against $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$. Therefore there must be two discrimination steps - one before and one after the formation of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$.

$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, given at 20 times the concentration of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, had significant antirachitic activity.

When $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ were given simultaneously, there was an even higher, synergistic effect on the induction of CaBP-synthesis in the duodenal mucosa.

7. Literaturverzeichnis

AMMON, R. und W. DIRSCHERL, (1974):

Fermente, Hormone, Vitamine. Bd. III/1

Georg Thieme Verlag, Stuttgart S. 247

ARMBRECHT, H. J., T. V. ZENSER, B. B. DAVIS (1980):

Effect of vitamin D metabolites on intestinal calcium absorption and calcium-binding protein in young and adult rats.

Endocrinology 106, 469 - 475

ARNOLD, R. M. (1954):

Manchester wasting disease, a disease of ruminants, manifested by metastatic calcification especially of cardiovascular system.

West Indies Med. J. 3, 1 - 8

BARBARYKIN, D. A., V. K. BAUMAN, M. Y. VALINIETSE, R. L. ROSENTAL (1982):

Similarity and differences in $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ antirachitic effects.

In: Vitamin D: Chemical, biochemical and clinical endocrinology of calcium metabolism. (Ed.: A. W. Norman, K. Schaefer, D. v. Herrath, H. G. Grigoleit)

Walter de Gruyter, Berlin/New York, 1201 - 1203

BARNETT, B. J., C. Y. CHO, S. J. SLINGER (1982):

Relative biopotency of dietary ergocalciferol and cholecalciferol and the role of and requirement for vitamin D in rainbow trout (*Salmo gairdneri*).

J. Nutr. 112, 2011 - 2019

BELSEY, R. E., H. F. DELUCA, J. T. POTTS, Jun. (1974):
Selective binding properties of vitamin D transport protein
in chick plasma in vitro.

Nature 247, 208 - 209

BHATTACHARYYA, M. H. and H. F. DELUCA (1974):
Subcellular location of rat liver cholecalciferol-25-hydroxy-
lase.

Arch. Biochem. Biophys. 160, 58 - 62

BIKLE, D. D., R. L. MORRISSEY, D. T. ZOLOCK (1979):
The mechanism of action of vitamin D in the intestine.

Am. J. Clin. Nutr. 32, 2322 - 2338

BITTNER, P. (1979):

Vergleichende Untersuchungen von *Trisetum flavescens*, Chole-
calciferol und 1,25-Dihydroxycholecalciferol an Hühnerküken.

Vet. Med. Diss., München

BJÖRKHEM, I. and I. HOLMBERG (1978):

Assay and properties of a mitochondrial 25-hydroxylase
active on vitamin D₃.

J. Biol. Chem. 253, 842 - 849

BOUILLON, R. and H. VAN BAELEN (1980):

Vitamin D-transport.

Acta Paediatr. Belg. 33, 3 - 7

BOYLE, I. T., R. W. GRAY and H. F. DELUCA (1971):

Regulation by calcium of in vivo synthesis of 1,25-dihydroxy-
cholecalciferol and 21,25-dihydroxycholecalciferol.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2131 - 2134

BOYLE, I. T., L. MIRAVET, R. W. GRAY, M. F. HOLICK, H. F. DELUCA (1972):

The response of intestinal calcium transport to 25-hydroxy- and 1,25-dihydroxyvitamin D in nephrectomized rats.

Endocrinology 90, 605 - 608

BROMMAGE, R., K. JARNAGIN, H. F. DELUCA, S. YAMADA, H. TAKAYAMA (1983):

1-but not 24-hydroxylation of vitamin D is required for skeletal mineralization in rats.

Am. J. Physiol. 244, E 298 - E 304

BRUMBAUGH, P. F., M. R. HUGHES, M. R. HAUSSLER (1975):

Cytoplasmatic and nuclear binding components for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in chick parathyeroidea glands.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 4871 - 4874

CANTERBURY, J. M., S. LERMAN, H. J. CLAVLIN, H. HENRY, A. NORMAN, E. REISS (1978):

Inhibition of parathyreoid hormone secretion by 25-hydroxy-cholecalciferol and 24,25-dihydroxycholecalciferol in the dog.

J. Clin. Invest. 61, 1375 - 1383

CAPEN, C. C., C. R. COLE, J. W. HIBBS (1966): The pathology of hypervitaminosis D in cattle.

Path. Vet. 3, 350 - 378

CHARLES, M. A., J. MARTIAL, D. ZOLOCK, R. MORRISSEY, J. D. BAXTER (1981):

Regulation of calcium-binding protein messenger RNA by 1,25-dihydroxycholecalciferol.

Calc. Tiss. Int. 33, 15 - 18

CHEN, P. S. and H. B. BOSMAN (1964): Effect of vitamin D₂ and D₃ on serum calcium and phosphorus in rachitic chicks.
J. Nutrition 83, 133 - 139

CHEN, T. C., L. CASTILLO, M. KORYCKA-DAHL, H. F. DELUCA (1974):

Role of vitamin D metabolites in phosphate transport of rat intestine.

J. Nutr. 104, 1056 - 1060

CHRISTAKOS, S. and A. W. NORMAN (1979): Studies on the mode of action of calciferol. XVIII: Evidence for a specific high affinity binding protein for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in chick kidney and pancreas.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 56 - 58

COLLIER, W. A., (1927):

Zur Kenntnis einer als "Enteque" bezeichneten Krankheit der Rinder in der Provinz Buenos Aires.

Z. Infek.-Kr., paras. Kr., Hyg. Hst. 31, 81 - 92

CORRADINO, R. A. and R. H. WASSERMAN (1971):

Vitamin D₃: Induction of calcium-binding protein in embryonic chick intestine in vitro.

Science 172, 731 - 733

CORVOL, M. T., M. F. DUMONTIER, M. GARABEDIAN, R. RAPPAPORT (1978):

Vitamin D and cartilage. II. Biological activity of 25-hydroxycholecalciferol and 24,25- and 1,25-dihydroxycholecalciferol on cultured growth plate chondrocytes.

Endocrinology 102, 1269 - 1274

CORVOL, M. T., M. F. DUMONTIER, A. ULMANN, M. GARABEDIAN, G. WITMER (1979):

Nuclear binding of $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and its effect on DNA polymerase activities in cultured chondrocytes.

In: Vitamin D: Basic research and its clinical application. (Ed.: A. W. Norman, K. Schaefer, D. v. Herrath, H. G. Grigoleit, J. W. Coburn, H. F. DeLuca, E. B. Mawer, T. Suda) Walter de Gruyter, Berlin/New York, 419 - 424

DELUCA, H. F. (1983):

Vitamin D, its metabolites and important analogs.

In: Proceedings, Fifth International Conference on Production Disease in Farm Animals, Uppsala 1983, 3 - 11

DELUCA, H. F. and H. K. SCHNOES (1983):

Vitamin D: Recent advances.

Ann. Rev. Biochem. 52, 411 - 439

DIRKSEN, G., P. PLANK, A. SPIESS, T. HÄNICHEN, K. DÄMMRICH (1970):

Über die enzootische "Kalzinose" beim Rind. 1. Klinische Beobachtungen und Untersuchungen.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 77, 321 - 338

DIRKSEN, G., P. PLANK, T. HÄNICHEN, A. SPIESS (1972):

Über die enzootische Kalzinose beim Rind. 5. Experimentelle Untersuchung an Kaninchen mit selektiver Verfütterung von Knaulgras (*Dactylis glomerata*), Goldhafer (*Trisetum flavescens*) und einem Grasgemisch.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 79, 77 - 79

DIRKSEN, G., M. WOLF, U. GEBERT, F. J. KAEMMERER (1981):

Trisetum flavescens: Hinweis auf eine wasserlösliche Wirksubstanz.

Zbl. Vet. Med. A 28, 429 - 435

DÜBEREINER, J., C. H. TOKARNIA, J. B. DA COSTA, J. L. E. DE CAMPOS, M. DAYRELL (1971):

"Espichamento", intoxicatio de bovinos por *Solanum malacoxylon*, nopastoral de mato grosso.

Pesq. agropec. bras. Ser. Vet. 6, 91 - 117

DRESCHER, D., H. F. DELUCA, M. H. IMRIE (1969):

On the site of discrimination of chicks against vitamin D₂.

Arch. Biochem. Biophys. 130, 657 - 661

EDELSTEIN, S., D. E. M. LAWSON, E. KODICEK (1973):

The transporting protein of cholecalciferol and 25-hydroxy-cholecalciferol in serum of chicks and other species.

Biochem. J. 135, 417 - 426

ELGAVISH, A., J. RIFKIND, B. SACKTOR (1983):

In vitro effects of vitamin D₃ on the phospholipids of isolated renal brush border membranes.

J. Membrane Biol. 72, 85 - 91

ESPARAZA, M. S., M. VEGA, R. L. BOLAND (1982):

Synthesis of vitamin D₃-metabolites in *Solanum malacoxylon*.

Biochem. Biophys. Acta 719, 633 - 640

FRANCESCHI, R. T. and H. F. DELUCA (1981):

Characterization of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent calcium uptake in cultured embryonic chick duodenum.

J. Biol. Chem. 256, 3840 - 3847

FRIEDLANDER, E. J., H. L. HENRY, A. W. NORMAN (1977):

Studies on the mode of action of calciferol. Effects of dietary calcium and phosphorus on the relationship between the 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase and production of chick intestinal calcium binding protein.

J. Biol. Chem. 252, 8677 - 8683

GARABEDIAN, M., M. B. DEBOIS, M. T. CORVAL, E. PEZANT and S. BALSAN (1978):

Vitamin D and cartilage. I. In vitro metabolism of 25-hydroxycholecalciferol by cartilage.

Endocrinology 102, 1262 - 1268

GHAZARIAN, J. G., C. R. JEFCOATE, J. C. KNUTSON, W. H. ORME-JOHNSON, H. F. DELUCA (1974):

Mitochondrial cytochrome P-450. A component of chick kidney 25-hydroxycholecalciferol-1 α -hydroxylase.

J. Biol. Chem. 249, 3026 - 3033

GHISJEN, W. E. J. M. and C. H. VAN OS (1982):

Regulation of Ca-ATPase and active Ca transport in basolateral membranes by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in rat duodenum.

Proc. Fifth Workshop on Vitamin D, Williamsburg, VA, Feb 14-19, 1982 S. 106

GRAY, R. W., J. L. OMDAHL, J. G. GHAZARIAN, H. F. DELUCA (1972):

25-Hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase. Subcellular location and properties.

J. Biol. Chem. 247, 7528 - 7532

HALLORAN, B. P., H. F. DELUCA, E. BARTHELL, S. YAMADA, M. OHMORI, H. TAKAYAMA (1981):

An examination of the importance of 24-hydroxylation to the function of vitamin D during early development.

Endocrinology 108, 2067 - 2071

HASS, G. M., R. E. TRUEHEART, C. B. TAYLOR, M. STUMPE (1958):

An experimental histologic study of hypervitaminosis D.

Amer. J. Path. 34 (3), 395 - 431

HAY, A. W. M. and G. WATSON (1976a):

The plasma transport proteins of 25-hydroxycholecalciferol in mammals.

Comp. Biochem. Physiol. 53, 163 - 166

HAY, A. W. M. and G. WATSON (1976b):

The plasma transport proteins of 25-hydroxycholecalciferol in fish, amphibians, reptiles and birds.

Comp. Biochem. Physiol. 53, 167 - 172

HENRY, H. L. and A. W. NORMAN (1976):

Studies on calciferol metabolism. XIII. Regulation of 25-hydroxyvitamin D₃-1-hydroxylase in isolated renal mitochondria

Arch. Biochem. Biophys. 172, 582 - 589

HENRY, H. L. and A. W. NORMAN (1978):

Vitamin D: two dihydroxylated metabolites are required for normal chicken egg hatchability.

Science 201, 835 - 837

HENRY, H. L. (1979): Regulation of the hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃ in vivo and in primary cultures of chick kidney cells.

J. Biol. Chem. 254, 2722 - 2729

HENRY, H. L. (1982):

The role of parathyroid hormone in the regulation of the metabolism of 25-hydroxyvitamin D₃.

Mineral Electrolyte Metab. 8, 179 - 187

HIGAKI, M. M. TAKAHASHI, T. SUZUKI, Y. SAHASHI (1965):

Metabolic activities of vitamin D in animals.

III. Biogenesis of vitamin D sulfate in animal tissues.

J. Vitaminol. 11, 261 - 265

- HOLICK, M. F., M. GARABEDIAN, H. F. DELUCA (1972a):
1,25-Dihydroxycholecalciferol. Metabolite of vitamin D₃
active on bone in anephric rats.
Science 176, 1146 - 1147
- HOLICK, M. F., H. K. SCHNOES, H. F. DELUCA, R. W. GRAY, I.
T. BOYLE and T. SUDA (1972b):
Isolation and identification of 24,25-dihydroxycholecalciferol, a metabolite of vitamin D₃ made in the kidney.
Biochemistry 11, 4251 - 4255
- HORST, R. L., E. T. LITLEDIKE, J. L. RILEY, J. L. NAPOLI
(1981):
Quantitation of vitamin D and its metabolites and their
plasma concentrations in five species of animals.
Anal. Biochem. 116, 189 - 203
- HORST, R. L., J. L. NAPOLI, E. T. LITLEDIKE (1982):
Discrimination in the metabolism of orally dosed ergocalciferol and cholecalciferol by the pig, rat and chick.
Biochem. J. 204, 185 - 189
- HORSTING, M. and H. F. DELUCA (1969):
In vitro production of 25-hydroxycholecalciferol.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 251 - 256
- HUGHES, M. R., P. BRUMBAUGH, M. R. HAUSSLER (1975):
Regulation of serum 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by calcium and
phosphate in the rat.
Science 190, 578 - 580
- HUMPHREYS, D. J. (1973):
Studies on the active principle of Solanum malacoxylon.
Nature 246, 155 - 157

HUNT, R. D., F. G. GARCIA, D. M. HEGSTED (1967):

A comparison of vitamin D₂ and D₃ in new world primates.

I. Production and regression of osteodystrophia fibrosa.

Lab. Anim. Care 17, 222 - 234

IMRIE, M. H., P. F. NEVILLE, A. W. SNELLGROVE, H. F. DELUCA (1967):

Metabolism of vitamin D₂ and vitamin D₃ in the rachitic chick.

Arch. Biochem. Biophys. 120, 525 - 532

JONES, G., H. K. SCHNOES, H. F. DELUCA (1975):

Isolation and identification of 1,25-dihydroxyvitamin D₂.

Biochemistry 14, 1250 - 1256

JONES, G., L. A. BAXTER, H. F. DELUCA, H. K. SCHNOES (1976a):

Biological activity of 1,25-dihydroxyvitamin D₂ in the chick.

Biochemistry 15, 713 - 716

JONES, G., H. K. SCHNOES, H. F. DELUCA (1976b):

An in vitro study of vitamin D₂-hydroxylases in the chick.

J. Biol. Chem. 251, 24 - 28

JONES, G., A. ROSENTHAL, D. SEGEV, Y. MAZUR, F. FROLOW, Y. HALFON, D. RABINOVICH, Z. SHAKKED (1979):

Isolation and identification of 24,25-dihydroxyvitamin D₂ using the perfused rat kidney.

Biochemistry 18, 1094 - 1102

JONES, G., H. K. SCHNOES, L. LEVAN, H. F. DELUCA (1980):

Isolation and identification of 24-hydroxyvitamin D₂ and 24,25-dihydroxyvitamin D₂.

Arch. Biochem. Biophys. 202, 450 - 457

JUAN D. and H. F. DELUCA (1977):

The regulation of 24,25-dihydroxyvitamin D₃ production in cultures of monkey kidney cells.

Endocrinology 101, 1184 - 1193

KANIS, J. A., T. CUNDY, M. BARTLETT, R. SMITH, G. HEYNEN, G. T. WARNER, R. G. G. RUSSELL (1978):

Is 24,25-dihydroxycholecalciferol a calcium-regulating hormone in man?

Br. Med. J. 1, 1382 - 1386

KNUTSON, J. C. and H. F. DELUCA (1974): 25-Hydroxy-vitamin D₃-24-hydroxylase. Subcellular location and properties.

Biochemistry 13, 1543 - 1548

KÖHLER, H. und R. LIBISELLER (1970):

Über das Auftreten der sogenannten Weidekrankheit bei Kühen in Österreich im Zusammenhang mit Düngung und Fütterung.

Zbl. Vet. Med. A 17, 289 - 337

KREAM, B. E., M. J. L. JOSE, H. F. DELUCA (1977):

The chick intestinal cytosol binding protein for 1,25-dihydroxyvitamin D₃: A study of analog binding.

Arch. Biochem. Biophys. 179, 462 - 468

KREITMAIR, H. und T. MOLL (1928): Hypervitaminose durch große Dosen Vitamin D.

Münch. Med. Wschr. 75 637 - 639 addendum 75, 1113

KROOK, L. P., R. H. WASSERMAN, J. N. SHIVELY, A. H. TASHJIAN jr., T. D. BROKKEN, J. F. MORTON (1975):

Hypercalcemia and calcinosis in Florida: Implication of the shrub, Cestrum diurnum, as the causative agent.

Cornell Vet. 65, 26 - 56

KUMAR, R., H. K. SCHNOES and H. F. DELUCA (1978):

Rat intestinal 25-hydroxyvitamin D₃ and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase.

J. Biol. Chem. 253, 3804 - 3809

KUMAR, R., S. NAGABUNDI, J. M. LONDOWSKI (1981):

Production of a polar metabolite of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in a rat liver perfusion system.

Dig. Dis. Sci. 26, 242 - 246

KUMAR, R., J. M. LONDOWSKI, M. P. MURARI, S. NAGABUNDI (1982):

Synthesis and biological activity of vitamin D₂-3 β -glucosiduronate and vitamin D₂-3 β -sulfate: Role of vitamin D₂ conjugates in calcium homeostasis.

J. Steroid Biochem. 17, 495 - 502

KUNZ, W. und T. HÄNICHEN (1981):

Solanum malacoxylon: Untersuchungen über die Verträglichkeit der zur Prophylaxe der hypocalzämischen Gebärlähmung empfohlenen Mengen.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94, 421 - 424

LAM, H.-Y., H. K. SCHNOES, H. F. DELUCA (1977):

Synthesis of 1 α -Hydroxyergocalciferol.

Steroids 30, Nr. 5, 671 - 677

LE VAN, L. W., H. K. SCHNOES, H. F. DELUCA (1981):

Isolation and identification of 25-hydroxyvitamin D₂-25-glucuronide: A biliary metabolite of vitamin D₂ in the chick.

Biochemistry 20, 222 - 226

LIGNIERS, J. (1898):

Contribution à l'étude de la pasteurellose bovine.

Bull. Soc. Centrale Med. Vet. (Paris), New Series 52, 761 - 792

LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL (1951):

Protein measurement with Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265 - 275

LYND, F. T., E. M. WILLERS, L. A. WEIGHT, P. W. GEBUR (1965):

Bovine arteriosclerosis in Hawaii.

Am. J. Vet. Res. 26, 1344 - 1349

MAC LAUGHLIN, J. A., M. M. WEISER, R. H. FREEDMAN (1980):

Biphasic recovery of vitamin D-dependent Ca^{2+} uptake by rat intestinal Golgi membranes.

Gastroenterology 78, 325 - 332

MALLUCHE, H. H., H. HENRY, W. MEYER-SABELLEK, D. SHERMAN, S. G. MASSRY, A. W. NORMAN (1980):

Effects and interactions of $24\text{R}, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on bone.

Am. J. Physiol. 238, E 494 - E 498

MANOLAGAS, S. C., C. M. TAYLOR, D. C. ANDERSON (1979):

Highly specific binding of $1, 25$ -dihydroxycholecalciferol in the bone cytosol.

J. Endocrinol. 80, 35 - 42

MC MENIMAN, N. P. (1976):

Solanum esuriale, a possible cause of humpy back in sheep.

Aust. Vet. J. 52, 432 - 433

MORRIS, K. M. L., J. P. SIMONITE, L. PALLAN, J. A. SIMPSON (1979).

Solanum torvum as a causative agent of enzootic calcinosis in Papua, New Guinea.

Res. Vet. Sci. 27, 264 - 267

MORRIS, K. M. L. (1982):

Plant induced calcinosis: A Review.

Vet. Hum. Toxicol. 24 (1), 34 - 48

MORRIS, K. M. L. and V. LECACK (1982):

Evidence for aqueous soluble vitamin D-like substances in the calcinogenic plant, *Trisetum flavescens*.

Life Sci. 30, 1255 - 1262

MUSSER, M. A., A. H. CANTOR, W. L. BACON (1977):

Intestinal calcium-binding protein levels in the one month old turkey poult.

Poultry Sci. 56, 1440 - 1442

NAGABUNDI, S., R. KUMAR, J. M. LONDOWSKI, R. A. CORRADINO, P. S. TIETZ (1980):

The role of vitamin D glucosiduronate in calcium homeostasis.

J. Clin. Invest. 66, 1274 - 1280

NAGABUNDI, S., J. M. LONDOWSKI, S. BOLLMAN, P. S. TIETZ, R. KUMAR (1981):

Synthesis and biological activity of vitamin D₃-3 β -sulfate: Role of vitamin D₃ sulfates in calcium homeostasis.

J. Biol. Chem. 256, 5536 - 5539

NAPOLI, J. L., L. E. REEVE, J. A. EISMAN, H. K. SCHNOES, H. F. DELUCA (1977):

Solanum glaucophyllum as a source of 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

J. Biol. Chem. 252, 2580 - 2583

NAPOLI, J. L., M. A. FIVIZZANI, H. K. SCHNOES, H. F. DELUCA (1979):

Synthesis of vitamin D₅: Its biological activity relative to vitamin D₃ and D₂.

Arch. Biochem. Biophys. 197, 119 - 125

NITSCHKE, H. (1980): Bestimmung der Aktivität des duodenalen calciumbindenden Proteins als Parameter Vitamin D-artiger Wirkung.

Vet. Med. Diss., München

NORMAN, A. W. (1979):

Vitamin D: The calcium homeostatic steroid hormone.

Academic Press, New York S. 39

NORMAN, A. W., J. ROTH, L. ORCI (1982):

The Vitamin D Endocrine System: Steroid metabolism, hormone receptors, and biological response (calcium binding proteins).

Endocrine Reviews Vol.3, No. 4, 331 - 366

OLSEN, E. B., J. C. KNUTSON, M. H. BHATTACHARYYA, H. F.

DELUCA (1976):

Effect of hepatectomy on the synthesis of 25-hydroxyvitamin D₃.

J. Clin. Invest. 57, 1213 - 1220

OMDAHL, J. L., and H. F. DELUCA (1972):

Rachitogenic activity of dietary strontium. I. Inhibition of intestinal calcium absorption and 1,25-dihydroxycholecalciferol synthesis.

J. Biol. Chem. 247, 5520 - 5526

PAAREN, H. E., H. F. DELUCA, H. K. SCHNOES (1980):

Direct C(1) hydroxylation of vitamin D₃ and related compounds.

J. Org. Chem. 45, 3253 - 3258

PAILER, M. und P. RIEDL (1978): Sterine in Weidegräsern.

Monatshefte f. Chemie 109, 1167 - 1176

PARDI, M. C. and J. A. DOS SANTOS (1947):

Ossificacao pulmonar e calcificacao vascular em bovinos do pantanal Mato Grosso.

Veterinaria (Brasilien) 1, 3 - 7

PEDERSEN, J. L., J. G. GHAZARIAN, N. R. ORME-JOHNSON, H. F. DELUCA (1976):

Isolation of chick renal mitochondrial ferredoxin active in the 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase system.

J. Biol. Chem. 251, 3933 - 3941

PETERLIK, M., K. BURSAC, M. R. HAUSSLER, M. R. HUGHES, R. H. WASSERMAN (1976):

Further evidence for the 1,25-dihydroxyvitamin D-like activity of Solanum malacoxylon.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 70, 797 - 804

PETERLIK, M., D. S. REGAL, H. KÖHLER (1977):

Evidence for a 1,25-dihydroxyvitamin D-like activity in Tri-setum flavescens: Possible cause for calcinosis in grazing animals.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 77, 775 - 781

PIKE, J. W., E. SPANOS, K. W. COLSTON, J. MC INTYRE, M. R. HAUSSLER (1978):

Influence of estrogen on renal vitamin D hydroxylases and serum 1,25(OH)₂D₃ in chicks.

Am. J. Physiol. 235, 338 - 343

PROCSAL, D. A., H. L. HENRY, T. HENDRICKSON, A. W. NORMAN (1976):

1,25-dihydroxyvitamin D-like component present in the plant Solanum glaucophyllum.

Endocrinology 99, 437 - 444

RAMBECK, W. A. and H. ZUCKER (1978): Non-identity of the steroid from *Trisetum flavescens* with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Abstracts 3rd Int. Workshop Calc. Tiss. Israel (1978), 57

RAMBECK, W. A., W. OESTERHELT, M. VECCHI, H. ZUCKER (1979): Occurrence of cholecalciferol in the calcinogenic plant *Trisetum flavescens*.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 87, 743 - 749

RAMBECK, W. A., O. KREUTZBERG, C. BRUNS-DROSTE, H. ZUCKER (1981a):

Vitamin D_3 in the grass *Trisetum flavescens*.

Z. Pflanzenphysiol. 104 (1), 9 -16

RAMBECK, W. A., H. WEISER, R. HASELBAUER, H. ZUCKER (1981b): Vitamin D activity of different vitamin D_3 esters in chicken, japanese quail and in rats.

Internat. J. Vit. Nutr. Res. 51, 353 - 358

RAMBECK, W. A., O. KREUTZBERG, H. ZUCKER (1982):

Ruminal fluid increases the vitamin D activity of *Trisetum flavescens*.

Fifth Workshop on Vitamin D, Historic Williamsburg, Virginia, Abstracts, 117

RAMBECK, W. A. und H. ZUCKER (1982): Vitamin D-artige Aktivitäten in calcinogenen Pflanzen.

Zbl. Vet. Med. A 29, 289 - 296

RAMBECK, W. A., U. HENNES, H. ZUCKER (1983):

Effect of calcinogenic plants (*Solanum malcoxydon* and *Trisetum flavescens*) on serum levels of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in rat.

Abstract XVIIth European Symposium on Calcified Tissue, Davos 1983 A 47

RAMBECK, W. A. (1983):

Persönliche Mitteilung

RAMBECK, W. A., H. WEISER, H. ZUCKER (1984):

Biological activity of 1,25-Dihydroxyergocalciferol in rachitic chick and in rat.

Int. J. Vit. Nutr. Res. 1984, in Druck

RASMUSSEN, H. and P. BORDIER (1980):

Evidence that different vitamin D sterols have qualitatively different effects in man.

Contr. Nephrol. 18, 184 - 191

RASMUSSEN, H., T. MATSUMOTO, O. FONTAINE, D. F. P. GOODMAN (1982):

Role of changes in membrane lipid structure in the action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

Fed. Proc. 41, 72 - 77

REEVE, L. E., H. K. SCHNOES, H. F. DELUCA (1978):

Biological activity of 1 α -hydroxyvitamin D₂ in the rat.

Arch. Biochem. Biophys. 186, 164 - 167

ROSS, F. P. and H. L. HENRY (1980):

Recent advances in the understanding of the metabolism and functions of vitamin D.

Clin. Orthopaed. Rel. Res. 149, 249 - 267

RUKSAN, B. and B. CARILLO (1976):

Efecto en ovinos del Solanum malacoxylon incubado con liquido de rumen.

Medicina (Buenos Aires) 36, 318 - 322

SCHAEFER, K. und VON HERRATH, D. (1981):
Aktueller Stand des Vitamin D-Stoffwechsels.
Nieren- und Hochdruckkrankheiten 10, Nr. 4 142 - 147

SCHWAB, K. (1983):
Vergleich synthetischer Glykoside von Vitamin D-Metaboliten
mit calcinogenen Pflanzeninhaltsstoffen.
Vet. Med. Diss., München

STARK, H. (1979):
Untersuchungen zur lichtabhängigen Bildung und Verteilung
von Cholecalciferol im Goldhafer (*Trisetum flavescens*)
Vet. Med. Diss., München

STEENBOCK, H., S. W. F. KLETZIEN, J. G. HALPIN (1932):
The reaction of the chicken to irradiated ergosterol and
irradiated yeast as contrasted with the natural vitamin D of
fish liver oil.
J. Biol. Chem. 97, 249 - 264

SUDA, T., H. F. DELUCA, H. K. SCHNOES, J. W. BLUNT (1969):
The isolation and identification of 25-hydroxyergocalciferol.
Biochemistry 8, 3515 - 3520

SUDA, T., H. F. DELUCA, Y. TANAKA (1970):
Biological activity of 25-hydroxyergocalciferol in rats.
J. Nutrition 100, 1049 - 1052

SWAN, J. B. (1952):
Toxic effects of massive dosis of calciferol on dairy cows.
Newzealand Vet. J., 1, 25 - 27

TANAKA, Y., H. F. DELUCA, Y. KOBAYASHI, T. TAGUCHI, N. IKEKAWA, M. MORISAKI (1979):

Biological activity of 24,24-difluoro-25-hydroxyvitamin D₃. Effect of blocking of 24-hydroxylation on the functions of vitamin D.

J. Biol. Chem. 254, 7163 - 7167

TAYLOR, A. N. and R. H. WASSERMAN (1965):

A vitamin D-dependent factor influencing calcium binding by homogenates of chick intestinal mucosa.

Nature, 205, 248 - 250

TAYLOR, A. N. and R. H. WASSERMAN (1967):

Vitamin D₃-induced calcium-binding protein: Partial purification, electrophoretic visualization and tissue distribution.

Arch. Biochem. Biophys. 119, 536 - 540

TAYLOR, A. N. (1981):

Immunocytochemical localization of the vitamin D-induced calcium-binding protein: Relocation of antigen during frozen section processing.

J. Histochem. Cytochem. 29, 65 - 73

TAYLOR, A. N. (1982):

Time course of immunocytochemical distribution of intestinal vitamin D-induced calcium-binding protein following 1,25-dihydroxyvitamin D₃.

In: Vitamin D: Chemical, biochemical and clinical endocrinology of calcium metabolism. (Ed.: A. W. Norman, K. Schaefer, D. v. Herrath, H. G. Grigoleit)

Walter de Gruyter, Berlin/New York, 221 - 223

TILLEY, J. M. A. (1967):

Enteque seco in Argentina. Annual report.

Grassland Res. Inst., Hurley, UK: 73 - 76

WALLING, M. W. and D. V. KIMBERG (1975):

Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and solanum glaucophyllum on intestinal calcium and phosphate transport and on plasma Ca, Mg and P levels in the rat.

Endocrinology 97, 1567 - 1576

WASER, J., J. MEYER, T. HÄNICHEN und G. DIRKSEN (1983):

Trisetum flavescens und Vitamin D₃: Vergleich der kalzinogenen Wirkung beim Schaf.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 96, 163 - 166

WASSERMAN, R. H. and A. N. TAYLOR (1966):

Vitamin D₃-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa.

Science 152, 791 - 793

WASSERMAN, R. H., R. A. CORRADINO and A. N. TAYLOR, (1968):

Vitamin D-dependent calcium-binding protein. Purification and some properties.

J. Biol. Chem. 243, 3978 - 3986

WASSERMAN, R. H. and R. A. CORRADINO (1973):

Vitamin D, calcium and protein synthesis.

Vit. Horm. 31, 43 - 103

WASSERMAN, R. H. (1974):

Calcium absorption and calcium binding protein synthesis: Solanum malcoxydon reverses strontium inhibition.

Science 183, 1092 - 1094

WASSERMAN, R. H. and A. N. TAYLOR (1974):

Die physiologische Bedeutung des Vitamin D-abhängigen calciumbindenden Proteins.

Triangel 12, 119 - 127

WASSERMAN, R. H., R. A. CORRADINO, L. P. KROOK (1975):
Cestrum diurnum: A domestic plant with 1,25-dihydroxychole-
calciferol-like activity.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 62, 85 - 91

WASSERMAN, R. H., J. D. HENION, M. R. HAUSSLER, T. A. MC
CAINE (1976):

Calcinogenic factor in Solanum malcoxydon: Evidence that it
is 1,25-dihydroxyvitamin D₃-glycoside.

Science 194, 853 - 854

WASSERMAN, R. H., R. A. CORRADINO, J. J. FEHER, H. J.
ARMBRECHT (1977):

Temporal patterns of response of the intestinal calcium
absorptive system and related parameters to 1,25-dihydroxy-
cholecalciferol.

In.: Vitamin D: Basic research and its clinical application.

(Ed.: A. W. Norman, K. Schaefer, D. v. Herrath, H. G.
Grigoleit, J. B. Coburn, H. F. Deluca, E. B. Mawer, T. Suda)

Walter de Gruyter, Berlin/New York 331 - 340

WASSERMAN, R. H. and C. S. FULLMER (1983):

Calcium transport proteins, calcium absorption, and vitamin
D.

Ann. Rev. Physiol. 45, 375 - 390

WECKSLER, W. R., F. P. ROSS, A. W. NORMAN (1979):

Characterization of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor
from rat intestinal cytosol.

J. Biol. Chem. 254, 9488 - 9491

WENDELAAR BONGA, S. E., P. I. LAMMERS, J. C. A. VAN DER MEIJ (1983):

Effects of 1,25- and 24,25-dihydroxyvitamin D₃ on bone formation in cichlid teleost *Saratherodon mossambicus*.

Cell Tissue Res. 228, 117 - 126

WIENTROUB, S. and A. H. REDDI (1982):

vitamin D metabolites and endochondral bone development.

In: Current advances in skeletogenesis. (Ed.: M. Silberman and H. C. Slavkin) Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton, International Congress Series 589, 211 - 217

WIESNER, R. H., R. KUMAR, E. SEEMAN, V. L. W. GO (1980):

Enterohepatic physiology of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ metabolites in normal man.

J. Lab. Clin. Med. 96, 1094 - 1100

WIESNER, R., J. LONDOWSKI, S. BOLLMAN, M. SCOTT, V. L. W. GO, R. KUMAR (1981):

Physiology of 24,25-dihydroxyvitamin D₃ in normal man: Production and degradation rates; evidence for biliary excretion and an enterohepatic circulation.

Clin. Res. 29, 426 A

WORKER, N. A. and B. J. CARILLO (1967):

"Enteque seco", calcification and wasting in grazing animals in the Argentine.

Nature 215, 72 - 74

ZUCKER, H. und J. GROPP (1968):

Vitamin D₃-Bestimmung über die Eischalenbildung bei der japanischen Wachtel.

Naturwiss. 55, 447 - 455

ZUCKER, H., O. KREUTZBERG, W. A. RAMBECK (1977):

Vitamin D-like action of a steroid from *Trisetum flavescens*.
Proceeding of the third Workshop on vitamin D, Asilomar,
USA, 85 - 87

ZUCKER, H., H. STARK, W. A. RAMBECK (1980):

Light dependent synthesis of cholecalciferol in a green
plant.

Nature 283, 68 - 69

ZUCKER, H. und W. A. RAMBECK (1981):

Vitamin D₃ und Vitamin D₃-metabolitartige Aktivität in *Trisetum flavescens*.

Zbl. Vet. Med. A 28, 436 - 441

Herrn Professor Dr. H. Zucker danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. W. A. Rambeck für die jederzeit gewährte Hilfe und für zahlreiche wertvolle Anregungen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich Frau A. Wetzel für die hilfreiche Beratung in technischen Fragen und für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche danken.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Fräulein A. Bachhuber sowie der Kollegin K. Goralczyk und den Kollegen K. Schwab, H. Dopinar, E. Bundscherer und A. Sappl für die hilfsbereite Unterstützung bei der technischen Durchführung der Versuche.

Mein Dank gilt auch dem Labor- und Tierpflegepersonal der Abteilung am Oberriesenfeld für die gewährte Hilfe und Beratung.

LEBENS LAUF

Curt Uwe Tröger

24.01.1955	geboren in Laichingen Vater: Fritz Tröger, Kaufmann Mutter: Else Tröger, geb. Schlenk
1962 - 1966	Besuch der Volksschule Laichingen
1966 - 1974	Besuch des Gymnasiums Laichingen
14.06.1974	Reifezeugnis
1974 - 1976	Wehrdienst
WS 1976/77 - SS 1982	Studium der Tiermedizin an der Freien Universität Berlin
14.06.1982	Staatsexamen
24.06.1982	Approbation als Tierarzt
November 1982	Beginn der Arbeiten zu der vorlie- genden Dissertation am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität Mün- chen
01.09.1983 - 29.02.1984	Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft am oben genannten Insti- tut

